



TITLE:

プラスミドDNA/カチオン性リポソーム複合体の物理化学的性質と遺伝子発現効率の関連に関する研究(Dissertation\_全文)

AUTHOR(S):

櫻井, 文教

---

CITATION:

櫻井, 文教. プラスミドDNA/カチオン性リポソーム複合体の物理化学的性質と遺伝子発現効率の関連に関する研究. 京都大学, 2001, 博士(薬学)

ISSUE DATE:

2001-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3183312>

RIGHT:

プラスミド DNA/カチオン性リポソーム複合体の物理化学的  
性質と遺伝子発現効率の関連に関する研究

櫻 井 文 教

# 目次

総論の部	1
緒言	1
第 I 章 プラスミド DNA/カチオン性リボソーム複合体の物理化学的性質と <i>in vitro</i> における細胞内動態および遺伝子発現効率の関連	2
I-1 プラスミド DNA/カチオン性リボソーム複合体の物理化学的性質および構造	3
1-a 異なる電荷比からなる複合体の粒子径およびゼータ電位	4
1-b 原子間力顕微鏡 (Atomic force microscopy) による複合体の構造の観察	6
I-2 各種培養細胞におけるプラスミド DNA/カチオン性リボソーム複合体による遺伝子発現効率および細胞毒性	6
2-a 異なる電荷比からなる複合体による各種培養細胞における遺伝子発現効率	6
2-b 異なる電荷比からなる複合体による各種培養細胞における細胞毒性	7
I-3 プラスミド DNA/カチオン性リボソーム複合体の細胞内取り込みおよび細胞内動態	8
3-a 放射標識プラスミド DNA を用いた複合体の細胞内取り込み特性の検討	8
3-b エチジュウムブロマイド・インターカレーション・アッセイを用いた複合体からのプラスミド DNA 放出の検討	9
3-c 蛍光標識プラスミド DNA/rhodamine 標識カチオン性リボソーム複合体を用いた細胞内動態の検討	11
I-4 考察	11
第 II 章 プラスミド DNA/カチオン性リボソーム複合体の物理化学的性質と静脈内投与時の遺伝子発現効率の関連	16
II-1 DOTMA/Chol 複合体、DOTMA 複合体および DOTMA/DOPE 複合体の物理化学的性質および構造	17
1-a 複合体の粒子径およびゼータ電位	18
1-b 蛍光偏向解消法を用いたカチオン性リボソームの膜流動性の検討	18
1-c 原子間力顕微鏡による複合体の構造の観察	19
1-d X 線小角散乱法による複合体の構造の検討	20
II-2 複合体と血球成分との相互作用	21
2-a 複合体の血球成分への結合	21
2-b 複合体と赤血球との相互作用	23
II-3 複合体の静脈内投与による <i>in vivo</i> 遺伝子発現効率	24
3-a 赤血球との相互作用が静脈内投与後の遺伝子発現効率に及ぼす影響	24
3-b 血清タンパクとの相互作用が静脈内投与後の遺伝子発現効率に及ぼす影響	25
3-c 静脈内投与後の肺における遺伝子発現細胞の同定	25

II-4	静脈内投与後の複合体の体内動態	26
II-5	ラット肺灌流法を用いた複合体の肺への集積に及ぼす血液成分の影響	26
5-a	血液成分との相互作用が肺への集積に及ぼす影響	27
5-b	灌流時における複合体の赤血球への結合	28
5-c	ラット血清による複合体の物理化学的性質の変化	29
5-d	複合体と相互作用したラット赤血球の肺への集積	29
II-6	考察	30
第III章	転移性肺癌モデルマウスへのインターフェロン（IFN）遺伝子導入による抗腫瘍効果	35
III-1	複合体の静脈内投与による肺でのインターフェロン発現	36
III-2	転移性肺癌モデルマウスへの複合体を用いた IFN 遺伝子導入による抗腫瘍効果	37
2-a	転移性肺癌モデルマウスの作成	37
2-b	複合体の静脈内投与による IFN 遺伝子導入の抗腫瘍効果	37
2-c	抗 IFN 抗体前処理による抗腫瘍効果阻害	38
III-3	複合体の静脈内投与による非特異的サイトカインの誘導	39
III-4	複合体の静脈内投与による非特異的サイトカイン誘導における肝クッパー細胞の関与	40
4-a	複合体の静脈内投与による血中への TNF- $\alpha$ および IFN- $\gamma$ 分泌	40
4-b	複合体の静脈内投与後の各臓器における TNF- $\alpha$ 量	41
4-c	静脈内投与後の複合体の体内動態に及ぼす Gadolinium Chloride 前処理の影響	41
III-5	考察	43
結論		46
謝辞		48
実験の部		49
第I章	実験の部	49
第II章	実験の部	53
第III章	実験の部	58
引用文献		61

## 総論の部

### 緒言

近年、ヒトゲノムの全塩基配列を解読しようとするヒトゲノム計画の進行や遺伝子工学の発展に伴い、多くの疾患の原因が遺伝子レベルで明らかになりつつある。そこでその疾患に対して治療上有効なタンパク質をコードしている遺伝子を導入することで治療しようとする試みが欧米を中心に行われており、本アプローチは先天性遺伝子欠損のみならず癌など様々な難治性疾患に対する有効な治療方法として期待されている。現在、体外に細胞を取り出し遺伝子を導入した後、再び体内に戻す *ex vivo* 法が臨床応用において汎用されているが、患者の負担や適応疾患などを考えると遺伝子を通常の医薬品のように直接体内に導入する *in vivo* 法の確立が期待されている。*in vivo* 遺伝子導入においては抗原性や安全性に問題を抱えるウイルスベクターに代わって、抗原性が低く調製の容易なプラスミド DNA を基本とする非ウイルスベクターが大いに期待されている。その遺伝子導入においてはプラスミド DNA が薬物であり遺伝子発現が薬理効果と考えられ、発現効率の向上および最適化を実現するためには、治療の最適化を目的として薬物動態の精密制御を図る技術であるドラッグデリバリーシステム (DDS) は必要不可欠な技術であり、医薬品として取り扱われる遺伝子に対する新しい DDS 技術の開発が有効な治療実現の鍵を握っていると思われる。しかしながら非ウイルスベクターを用いた遺伝子導入においては、標的細胞到達以前に起こる生体成分との相互作用や、細胞に内在化後の細胞内動態など従来の DDS 製剤以上に考慮しなければいけない点が多いにもかかわらず、現在のところ新規キャリアの開発や最終的な遺伝子発現効率にのみ焦点が当てられる場合が多く、ベクター自身の物理化学的性質や構造、およびそれらと遺伝子導入における各過程、さらには最終的な遺伝子発現効率との関連に関して総合的に議論されていないのが現状である。

そこで著者は最も注目されている遺伝子キャリアの一つであるカチオン性リボソームを選択し、プラスミド DNA/カチオン性リボソーム複合体の物理化学的性質や構造を明らかにするとともに、各種培養細胞を用いてそれらによって規定されと考えられる細胞内取り込み、細胞内動態および遺伝子発現効率とこれらの相関について明らかにした。次に静脈内投与による *in vivo* 遺伝子導入について、複合体の物理化学的性質と生体成分との相互作用、体内動態や各臓器での遺伝子発現効率との関連に関する情報を得た。さらにこれらの情報に基づき遺伝子発現とその生物学的効果との関係を調べる目的で、インターフェロン (IFN) 遺伝子を転移性肺癌モデルマウスに導入することで *in vivo* 遺伝子治療の可能性を示した。

以下、これらの結果について三章にわたり論述する。

## 第 I 章 プラスミド DNA/カチオン性リポソーム複合体の物理化学的性質と *in vitro* における細胞内動態と遺伝子発現効率の関連

プラスミド DNA (pDNA) を基本とした非ウイルスベクターは、抗原性の低さや調製の簡便さなどからウイルスベクターに代わる遺伝子ベクターとして期待されている (1-4)。非ウイルスベクターの中でも pDNA/カチオン性リポソーム複合体はその遺伝子発現効率の高さより最も注目されているベクターの一つであり、既にいくつかの臨床応用が行われている (5-12)。

pDNA/カチオン性リポソーム複合体による遺伝子導入においては複合体形成に始まり生体成分との相互作用、細胞表面への吸着、細胞内取り込み、核への DNA の輸送など様々なプロセスを経て遺伝子発現に至ると考えられている (Fig. 1) が、DNA は通常の医薬品と異なり、それが薬理効果を示すためには最終的に核まで到達する必要があるため、その細胞内動態も非常に重要であると思われる。しかし多くの検討では最終的な遺伝子発現効率のみに注目が集まり、複合体の物理化学的性質や構造、およびそれらと各プロセスとの関連についてはほとんど検討されていないのが現状である。

また複合体は pDNA 上のリン酸基に存在する負電荷とカチオン性脂質上に存在する正電荷との静電的相互作用により形成される。複合体の調製においては、目的のタンパク質をコードする遺伝子をドライブするプロモーターやカチオン性リポソームの脂質組成など考慮しなければいけない様々な要因が考えられるが (13-15)、なかでも pDNA とカチオン性リポソームの混合比 (電荷比) は遺伝子発現効率を決める最も大きな要因の一つである (16-18)。これまでに異なる電荷比で調製

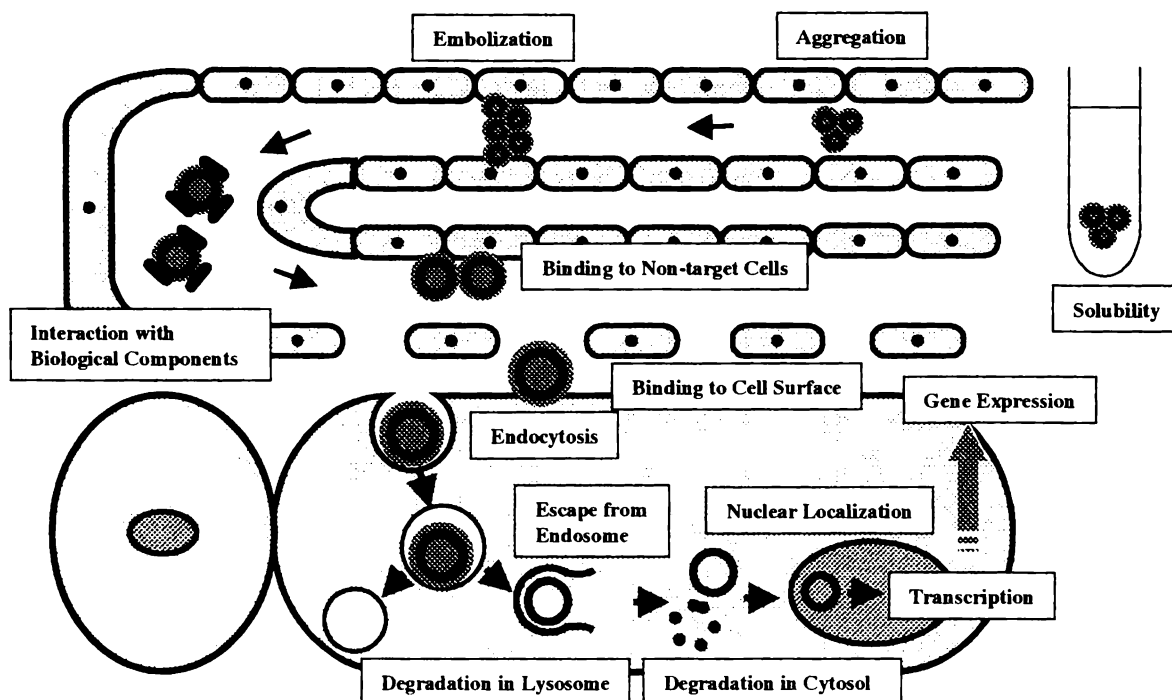
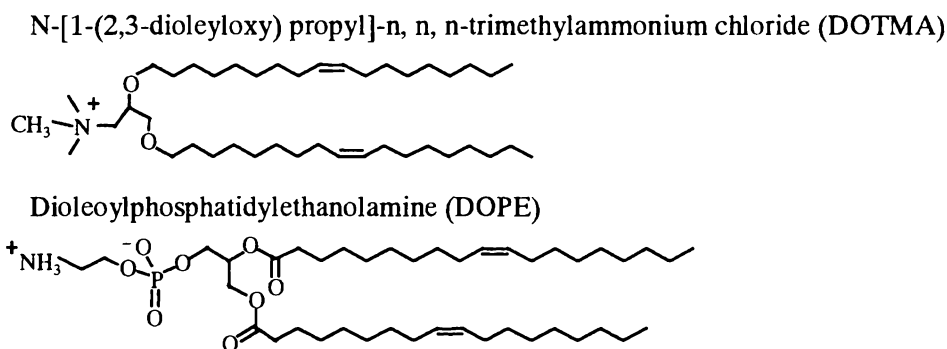
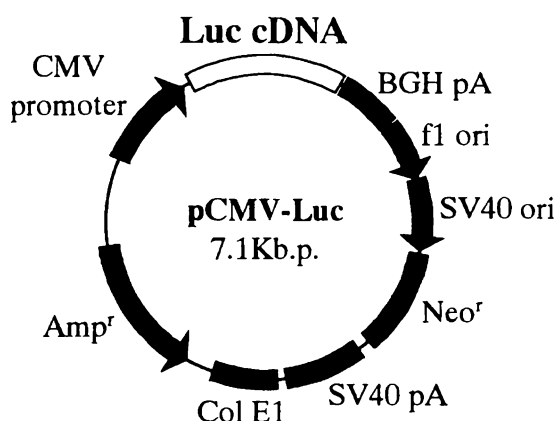


Fig. 1 Processes and barriers in cationic liposome-mediated gene transfer.

された複合体の物理化学的性質やそれらによる培養細胞での遺伝子発現効率に関してはそれぞれいくつか報告があるものの(19-24)、それら物理化学的性質と遺伝子発現効率の関連に関する総合的な議論はほとんどない。

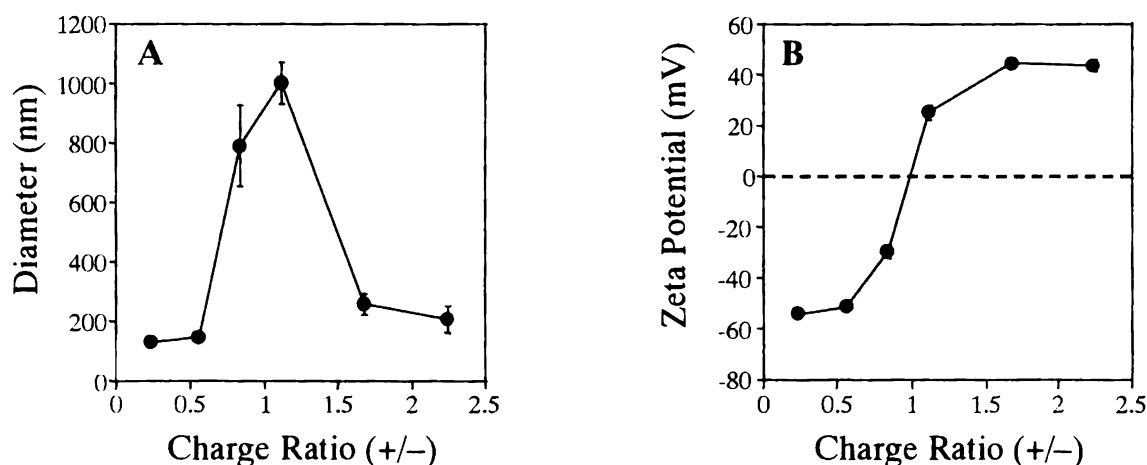


## I-1 プラスミド DNA/カチオン性リポソーム複合体の物理化学的性質および構造

複合体の粒子径および表面電荷はエンドサイトーシスによる複合体の細胞内取り込み及び細胞内動態を規定する要因であると考えられる。そこで本節では最終的な遺伝子発現に至る各プロセスに影響を及ぼすと考えられる複合体の粒子径や表面電荷、およびその構造について検討した。検討にはモデル pDNA として、ホタル・ルシフェラーゼ (Luc) をコードし、遺伝子導入時に強い転写活性を促すサイトメガロウイルス (CMV) プロモーターによってドライブされる pCMV-Luc (約 7100 b.p.) を用いた (Fig. 2)。カチオン性リボソームとしては既に培養細胞において高い遺伝子発現を示すことが知られている Lipofectin<sup>®</sup>と同じ組成であるカチオン性脂質 DOTMA と中性脂質 DOPE をモル比 1:1 で混合し調製した DOTMA/DOPE リボソームを用いた (Fig. 3)。

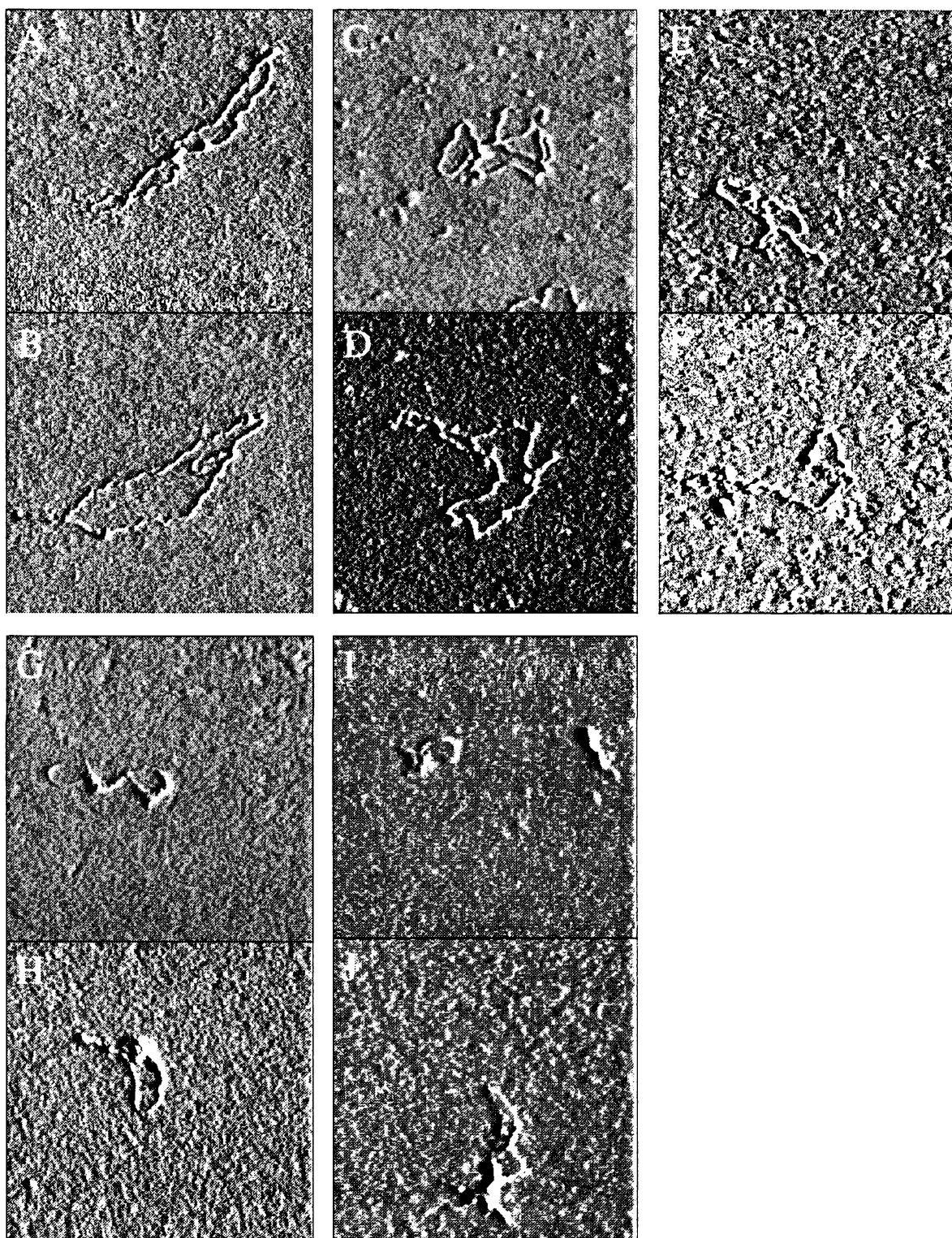
#### 1-a 異なる電荷比からなる複合体の粒子径およびゼータ電位

まず DOTMA/DOPE リボソーム単独の粒子径およびゼータ電位はそれぞれ 100 nm、+47 mV であった。複合体の粒子径は電荷比により大きく変化し (Fig. 4A)、電荷比+0.22 (+/-) においては約 120 nm であったが、電荷比の上昇に伴い電荷の中和に伴うと思われる粒子径の増大が観察され、電荷比+1.12 では最大値 1000 nm を示した。それ以上の電荷比では粒子径は減少し、+2.24 においては約 200 nm と減少した。一方、表面電荷の指標であるゼータ電位においても、+0.22 においては -55 mV と DNA に由来する大きな負電荷を示したが、電荷比の増加に伴い上昇し+1.12 では+25 mV と負から正へと転じた (Fig. 4B)。さらに電荷比+1.67 以上においては、カチオン性リボソーム単独とほぼ同じ値を示した (+45 mV)。



**Fig. 4 The particle size and zeta potential of the plasmid DNA-DOTMA/DOPE liposome complexes.** (A) particle size, (B) zeta potential. Plasmid DNA was mixed with DOTMA/DOPE liposome at various charge ratios in 150 mM NaCl. The particle size and zeta potential were plotted as a function of the charge ratio.





**Fig. 5 Atomic force microscopic images of the plasmid DNA-DOTMA/DOPE liposome complexes at various charge ratios.** Plasmid DNA was mixed with DOTMA/DOPE liposome at various charge ratios. (A) and (B) the complexes at +0.11 (+/-), (C) and (D) +0.56, (E) and (F) +1.12, (G) and (H) +2.24, (I) and (J) +22.4. Size of all panels is  $1 \times 1 \mu\text{m}$ . The panels shown are typical of the results of multiple evaluations.

## 1-b 原子間力顕微鏡 (Atomic force microscopy) による複合体の構造の観察

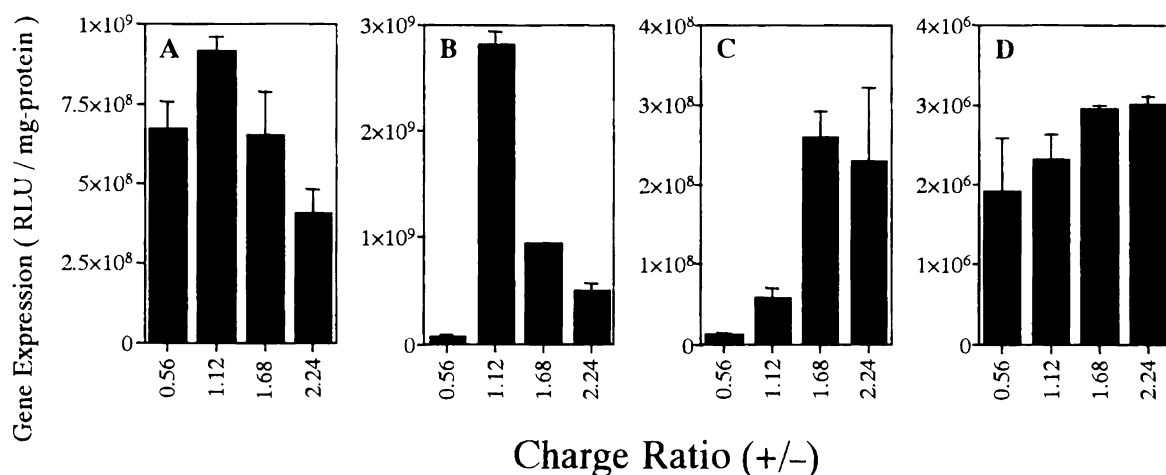
次に原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて種々の電荷比で調製した複合体の構造を観察した (Fig. 5)。まず電荷比+0.11 においては pDNA 単独とほとんど変わらず、DNA 鎖の広がった構造が観察された (Fig. 5A-B)。しかし電荷比+0.56、+1.12 においては、カチオン性リボソームによって pDNA が凝縮し複合体としての大きさも減少した (Fig. 5C-F)。しかし一方で電荷比+1.12 ではいくつかのプラスミド DNA からなる凝集した複合体も認められた。さらに高い電荷比 (+2.24、+11.2) ではプラスミド DNA は完全に凝縮しカチオン性リボソームに覆われている様子が観察された (Fig. 5H-K)。これらの結果から、カチオン性リボソームは低電荷比においては pDNA の形状に大きな変化を与えないが、電荷比の上昇に伴い pDNA 分子内で架橋を形成するような働きをするとともにリン酸基間の静電的反発を減少させることで pDNA を徐々に凝縮させることが明らかとなった。さらに高い電荷比ではカチオン性リボソームは pDNA の大部分を包み込んでしまうことで、複合体は非常にコンパクトな構造をとることが示された。

## I-2 各種培養細胞におけるプラスミド DNA/カチオン性リボソーム複合体による遺伝子発現効率および細胞毒性

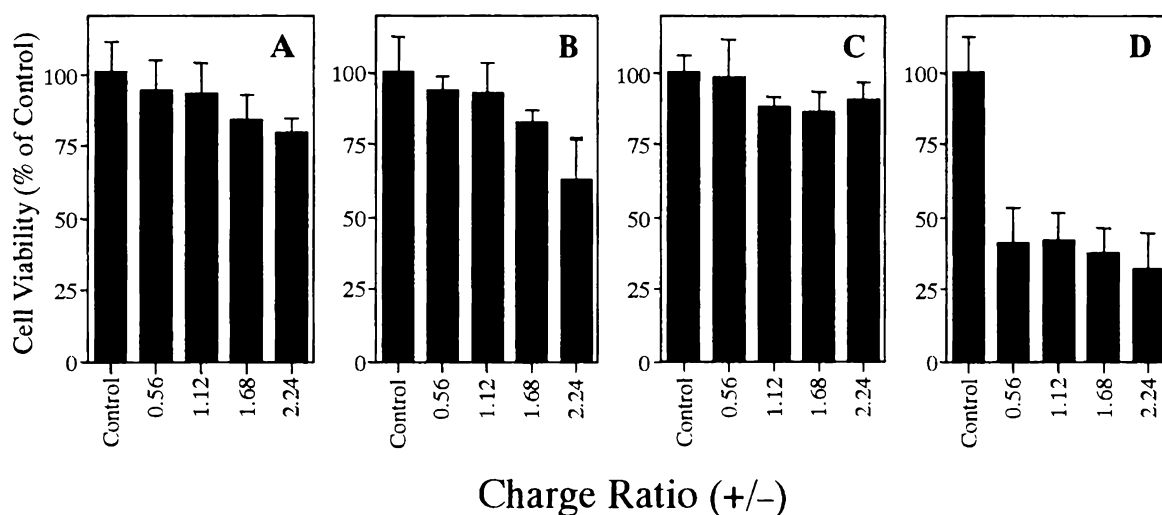
次に複合体の物理化学的性質と遺伝子発現効率や細胞内動態の関連について細胞レベルで検討するため、以上のような物理化学的性質を持つ複合体を用いて各種培養細胞に遺伝子導入を行った。また遺伝子発現効率を決める大きな要因と考えられている複合体の細胞毒性について、MTT assay を用いて検討した。

### 2-a 異なる電荷比からなる複合体による各種培養細胞における遺伝子発現効率

培養細胞としては MBT-2 (マウス膀胱癌細胞)、HUVEC (ヒト臍帯血管内皮細胞)、NIH3T3 (マウス繊維芽細胞)、RAW264 (マウスマクロファージ) を用いた。各電荷比で調製した複合体を用いて各培養細胞における遺伝子発現効率を比較検討したところ、最も高い遺伝子発現効率を示した HUVEC では  $2.8 \times 10^9$  RLU/mg-protein、最も低い発現効率しか見られなかった RAW264 では  $3 \times 10^6$  RLU/mg-protein と両者で約 1000 倍もの差が見られた (Fig. 6)。また遺伝子発現効率は複合体を調製した電荷比により大きく異なり、最適電荷比が存在することが明らかとなった。さらに最適電荷比が MBT-2、HUVEC では+1.12、NIH3T3 では+1.67、RAW264 では+2.24 と、細胞によって異なることが明らかとなった。またレポーター遺伝子として chloramphenicol acetyl transferase (CAT) を用いた場合においても、Luciferase の場合と同様の結果が得られた。



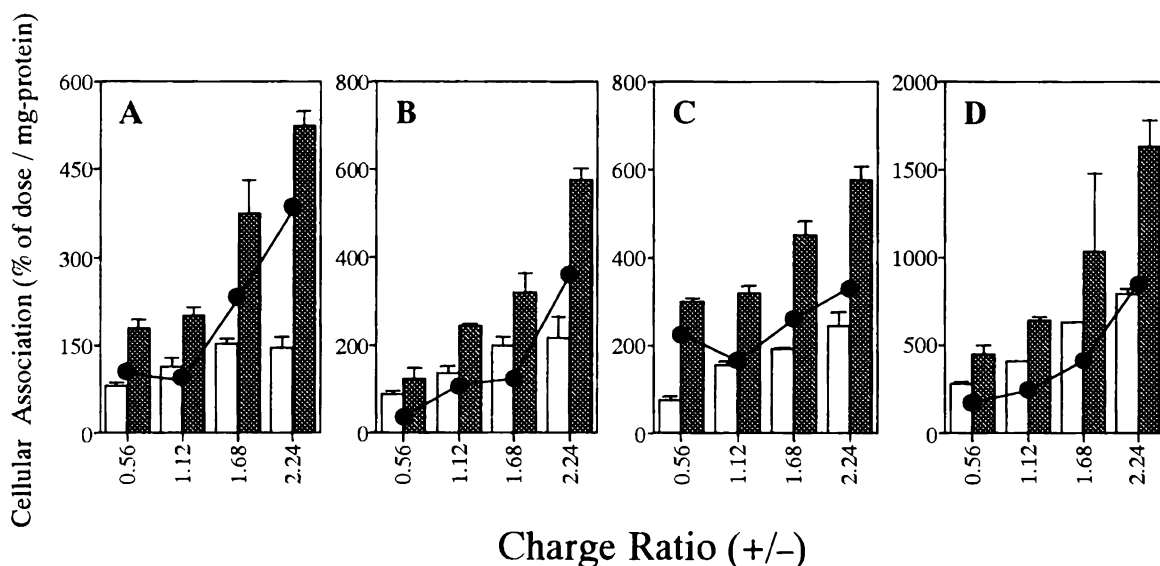
**Fig. 6** Transfection efficiency of the plasmid DNA-DOTMA/DOPE liposome complexes at various charge ratios in four types of cell lines, (A) MBT-2, (B) HUVEC, (C) NIH3T3, (D) RAW264. Luciferase activity was measured 48 h after transfection using plasmid DNA encoding firefly luciferase complexed with DOTMA/DOPE liposome.



**Fig. 7** Cytotoxic effects of the plasmid DNA-DOTMA/DOPE liposome complexes at various charge ratios on (A) MBT-2, (B) HUVEC, (C) NIH3T3, (D) RAW264. Determinations were performed after 6 h incubation with medium containing the complexes (0.5  $\mu$ g plasmid DNA/ml). Cell viability was measured by MTT assay. Data represent the % of cell viability compared with untreated cells.

## 2-b 異なる電荷比からなる複合体による各種培養細胞における細胞毒性

強い正電荷を持つ物質は強い細胞毒性を持つことが知られており、これまで高電荷比の複合体による遺伝子発現効率の減少は、複合体による細胞毒性が原因であると考えられてきた (30, 31)。そこで遺伝子発現効率と細胞毒性との関連について明らかにするため、各電荷比の複合体を細胞に添加してから6時間後の Cell viability について MTT assay を用いて検討した。その結果、RAW264 では全ての電荷比において顕著な細胞毒性が認められた。よって RAW264 における低い遺伝子発現効



**Fig. 8** Cellular association at 37°C (grey bar) and 4°C (open bar) of  $^{32}\text{P}$ -labeled plasmid DNA complexed with DOTMA/DOPE liposome at various charge ratios after 6 h incubation with (A) MBT-2, (B) HUVEC, (C) NIH3T3, (D) RAW264. Lines show the difference in the amount of  $^{32}\text{P}$ -labeled plasmid DNA cellular association between 37 °C and 4 °C.

率は複合体の細胞毒性によることが示唆された。しかし RAW264 を除く 3 種の培養細胞においては全ての電荷比において顕著な細胞毒性は見られなかった (Fig. 7)。また複合体添加 48 時間後においても電荷比の違いによる細胞毒性の違いは見られなかった。以上の結果より、今回の実験条件においては複合体による細胞毒性のみでは電荷比の違いによる遺伝子発現効率の違いを説明できないことが示唆された。

### I-3 プラスミド DNA/カチオン性リポソーム複合体の細胞内取り込みおよび細胞内動態

前節の結果より、遺伝子発現効率は細胞および電荷比により大きく異なり、また遺伝子発現における複合体の最適電荷比も細胞により異なることが明らかとなった。しかし複合体による細胞毒性の結果は遺伝子発現効率の結果と対応するものではなかったことから、 $^{32}\text{P}$  放射標識 pDNA を用いて 37°C および 4°C における複合体の細胞取り込みを検討した。さらにエチジウムブロマイド・インターカレーション・アッセイと共焦点レーザー顕微鏡を用いて複合体の細胞内動態について検討を加えた。

#### 3-a 放射標識 pDNA を用いた複合体の細胞内取り込み特性の検討

まず  $^{32}\text{P}$  放射標識 pDNA を用いて各電荷比の複合体を調製し、37°C および 4°C における 6 時間後の細胞内取り込み量を測定した。その結果、全ての細胞において電荷比の上昇に伴い 37°C、4°C と

もに取り込み量が増加した (Fig. 8)。4℃においてはエンドサイトーシスが阻害されることから、4℃における値を細胞表面吸着量、37℃における値を細胞表面吸着量と細胞内取り込み量の和と仮定すると、電荷比の上昇に伴い、細胞表面吸着量、細胞内取り込み量ともに増加することが明らかとなった。これは電荷比の上昇に伴い、複合体の表面電荷が上昇したこと、また粒子径が減少したことによると推察される。しかし最も低い遺伝子発現効率しか示さなかった RAW264 において最も高い取り込み量が観察され、また遺伝子発現における最適電荷比と最も高い細胞取り込みを示した電荷比が完全に対応しないなど、これらの結果は前節で示した遺伝子発現効率とは完全には対応しなかった。よって遺伝子発現効率の違いは複合体の細胞内取り込み量のみでは説明できないことが示された。

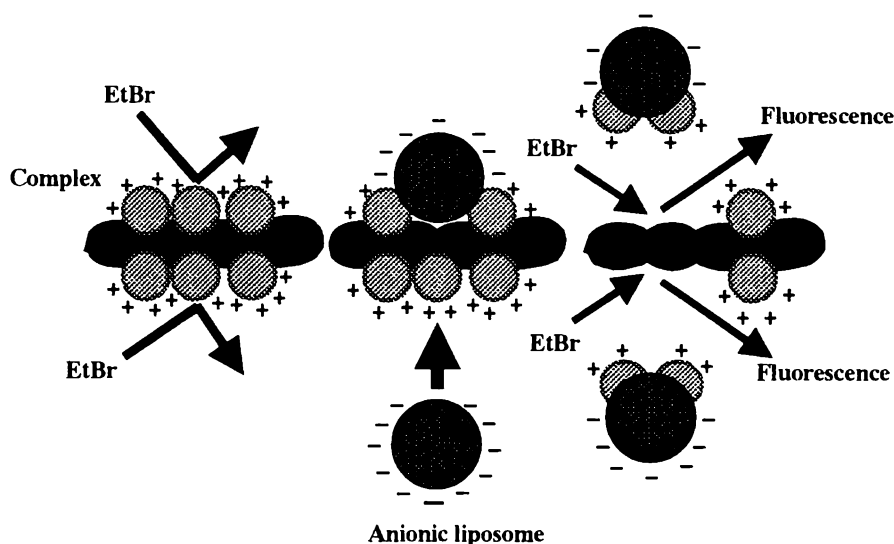
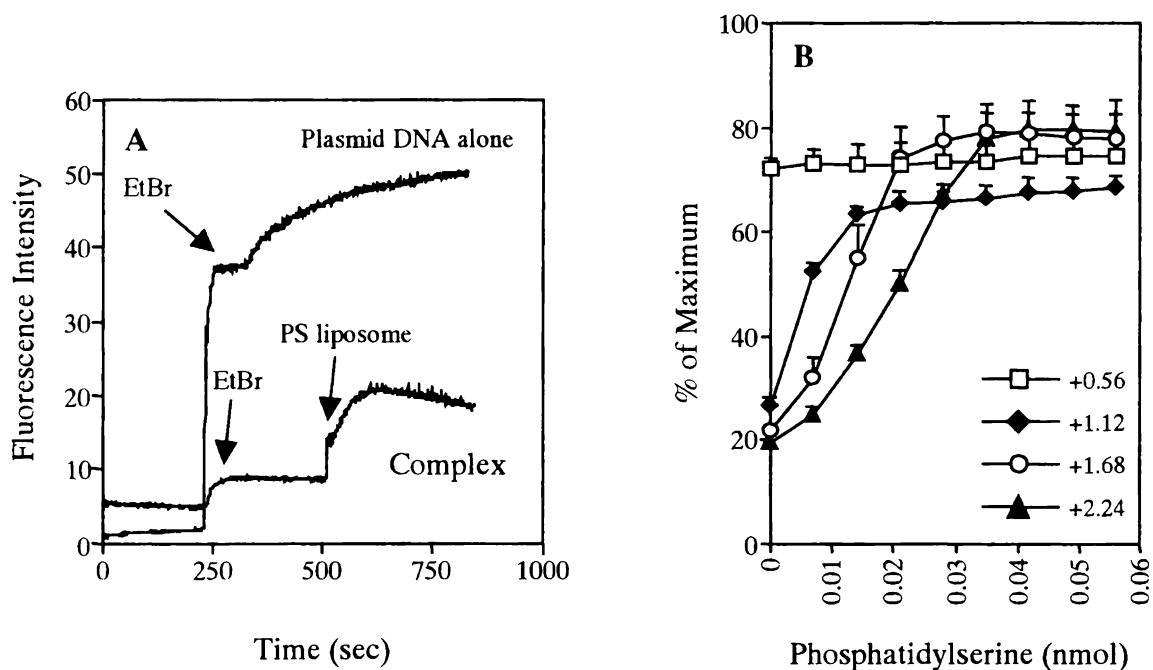


Fig. 9 Schematic model of ethidium bromide intercalation assay.

### 3-b エチジウムブロマイド・インターカレーション・アッセイを用いた複合体からのプラスミド DNA 放出の検討

複合体の細胞内取り込み量の違いのみでは各電荷比での遺伝子発現効率の違いを説明できないことから、複合体が細胞内に内在化を受けた後の細胞内動態について検討した。pDNA はカチオン性リボソームと複合体を形成した状態ではカチオン性リボソームが立体障害となり、転写がうまく行われない (32) という報告があることから、核に到達する以前にカチオン性リボソームから分離する必要がある。その分離に関しては複合体がエンドソーム膜と融合することによって複合体上のカチオン性脂質とエンドソーム膜上の負電荷との間で静電的中和が起こり、pDNA が複合体から分離し細胞質内に放出されると考えられている。そこで Szoka らの方法に従い (33)、エチジウムブロマイド・インターカレーション・アッセイを用いて電荷比の異なる複合体からの pDNA の放出について検討した。エチジウムブロマイド (EtBr) は二本鎖 DNA の塩基部分にインターカレー



**Fig. 10 Effect of anionic liposomes on DNA accessibility in the plasmid DNA-DOTMA/DOPE liposome complexes.** (A) plasmid DNA and the complex (charge ratio +1.68) were stirred with a magnetic stirrer beforehand. EtBr was injected at 250s, indicated by the arrow. PS/PE/PC (1/2/1, molar ratio) liposome was injected a 530s, indicated by the arrow. The fluorescence signal increased and stabilized within 250s. (B) EtBr was added to 20 mM Hepes containing the complexes at various charge ratios. The values are expressed as the function of the maximum fluorescence signal when EtBr was bound to plasmid DNA in the absence of DOTMA/DOPE liposome.

トすることで蛍光を発するインターカレート剤であるが、DNA がカチオン性リボソームと複合体を形成している場合、脂質成分が立体障害となりインターカレートできない (Fig. 10A)。そこにエンドソーム膜のモデルとして Phosphatidylserine (PS) 含有負電荷リボソーム (PS-liposome) を添加すると PS-liposome と複合体の脂質成分との間で静電的中和が起こり、カチオン性リボソームと pDNA との結合が弱まるため、エチジウムブロマイドがインターカレーションを起こす。そこで PS-liposome 添加によって観察される蛍光強度を pDNA の複合体からの放出の指標とし、電荷比の異なる複合体からの pDNA 放出を比較した。

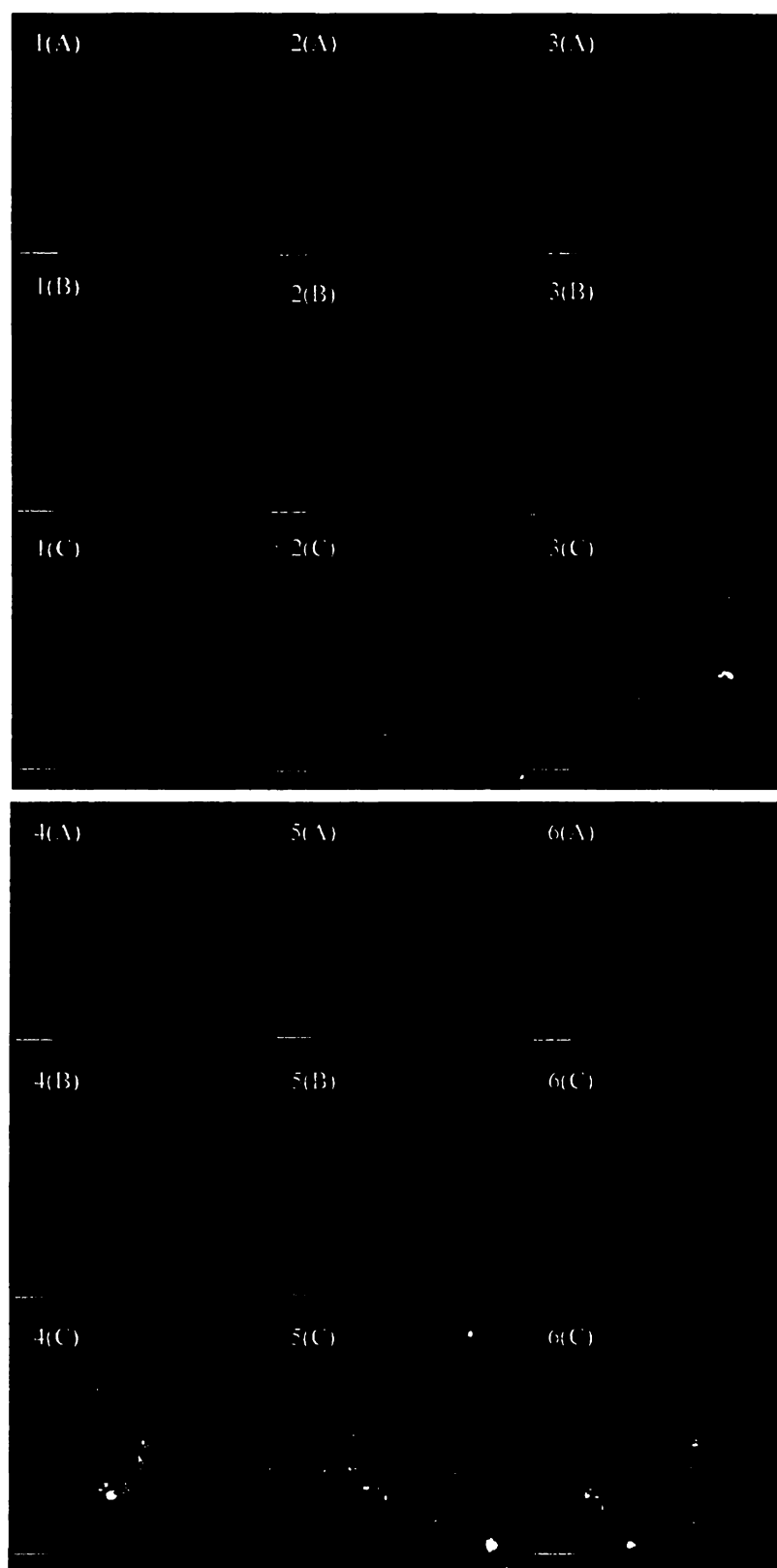
その結果、PS-liposome 添加による蛍光強度変化は複合体の電荷比によって大きく異なることが明らかとなった (Fig. 10B)。まず電荷比+0.56においては PS-liposome 添加による蛍光強度の変化は見られなかった。これは電荷比+0.56では複合体自身が大きな負電荷を持つため PS-liposome が相互作用しにくいこと、また複合体を形成していない単独の pDNA も存在することによると推察される。また電荷比+1.12においては PS-liposome 添加により緩やかな蛍光強度の上昇が見られ、さらに電荷比+1.67、+2.24においては明らかな蛍光強度の上昇が観察された。しかし蛍光強度が一定に達するまでに必要とする PS-liposome 量を比較すると、高い電荷比の複合体においてより多くの PS-liposome を必要とすることが明らかとなった。

### 3-c 蛍光標識プラスミド DNA/rhodamine 標識カチオン性リボソーム複合体を用いた細胞内動態の検討

以上の結果より、細胞内において複合体からの pDNA の放出の程度が複合体の電荷比の違いにより異なる可能性が示唆された。そこで pDNA とカチオン性リボソームをそれぞれ異なる蛍光波長を持つ蛍光マーカーで標識し、電荷比+1.12 および+2.24 の複合体を調製した。それらの複合体を HUVEC 細胞に添加し、4 時間後の細胞内分布を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した (Fig. 11)。その結果、まず電荷比+2.24 では+1.12 と比較し、pDNA およびカチオン性リボソームに由来する強い蛍光が観察され、高電荷比の複合体では低電荷比のものに比べより高い細胞内取り込み量を示すという本章 3-a と同様の結果が得られた。また両電荷比ともに pDNA に由来する緑の蛍光は大部分が顆粒状に存在し、複合体がエンドサイトーシスにより内在化を受けた後 pDNA は主にエンドソームやライソゾームに存在することが明らかとなった。一方複合体の脂質成分に関しては、pDNA と同様、顆粒状にも存在したが核周辺に拡散している様子が認められた。これは複合体の脂質成分が細胞内小器官の脂質膜に移行したためと思われる。両蛍光の重ね合わせ像においては、pDNA の蛍光と脂質成分の蛍光が同じ箇所が存在すると黄色の蛍光として観察されるが、電荷比+1.12 では pDNA に由来する緑色単独の蛍光が細胞質内に拡散している様子が観察された (Fig. 11/1-3)。これは複合体がエンドサイトーシスで取り込まれた後 pDNA が複合体から放出され、エンドソームから細胞質内に移行したことを示唆している。一方電荷比+2.24 では、重ね合わせ像において緑色単独の蛍光があまり見られず顆粒状に黄色の蛍光が観察されたことから (Fig. 11/4-6)、pDNA は複合体の脂質成分とともにエンドソームやライソゾーム内に滞留し細胞質内に放出されていないことが示された。これらの結果から、電荷比+1.12 では pDNA は細胞に取り込まれた後複合体から分離し細胞質内に放出されるが、電荷比+2.24 ではエンドソームやライソゾーム内に複合体の脂質成分とともに滞留し細胞質内に放出されないことが示唆された。

#### I-4 考察

カチオン性リボソームを用いた遺伝子導入は、その発現効率や安全性の高さ、調製の簡便さなどからウイルスベクターに代わる遺伝子導入方法として遺伝子治療への応用が大いに期待されている。その実現に向けて様々な研究が精力的に行われており、複合体の構造 (19-22)、細胞への吸着および取り込み (26, 27, 34, 35)、細胞内動態 (32, 33, 36-38) など遺伝子発現に関わると考えられるいくつかの要因について報告されている。しかしながらこれらの要因が複合体の物理化学的性質とどのように関連しているか、またどのようにして遺伝子発現に影響しているかについてはほとんど報告されていない。そこで本章では、まず pDNA/カチオン性リボソーム複合体の物理化学的性質や構造について明らかにするとともに、それらと複合体の細胞取り込みや細胞内動態、遺伝子発現効率との関連について検討した。



**Fig. 11** Confocal microscopic images showing HUVEC cells incubated with fluorescence-labeled plasmid DNA complexed with rhodamine-PE-labeled DOTMA/DOPE liposome at charge ratio of +1.12 (panel 1, 2, 3) and +2.24 (panel 4, 5, 6) for 4 hr at 37 °C. Panel A shows the intracellular distribution of fluorescence-labeled plasmid DNA. Panel B shows the intracellular distribution of rhodamine-labeled liposome. Panel C shows the intracellular distribution of both fluorescence-labeled plasmid DNA and rhodamine-labeled liposome. The panels shown are typical of the results of multiple evaluations. Bars indicate 10  $\mu$ m.



まず種々の電荷比で調製した複合体の粒子径およびゼータ電位について検討した。粒子径およびゼータ電位とも電荷比に伴い著しい変化を示した (Fig. 4)。低電荷比 (+0.22、+0.56) および高電荷比 (+1.67、+2.24) では粒子径は約 200 nm と小さな値を示したが、電荷が中和される電荷比+1付近では粒子径の増大が認められた。これは電荷の中和に伴い各複合体間の静電的反発が減少することによって、いくつかのプラスミド DNA から構成される凝集体ができたものと思われる。AFM を用いた検討においても電荷比+1.12 において多数の pDNA からなる 3  $\mu$ m 以上の凝集体が観察されている。しかし Fig. 5 に示したように、大きな凝集体を形成していない複合体も多く見られたことから、動的光散乱法により見かけの粒子径を測定した場合には、大きな凝集体の混在により平均値が上昇したものと思われる。また高い電荷比の複合体はカチオン性リボソーム単独と同じゼータ電位の値を示した。これは Fig. 5 に示したように pDNA がカチオン性リボソームによって完全に覆われていることを示唆している。Gershon らも電荷比+1.1 以上ではカチオン性リボソーム同士の融合および脂質の混合が起こることによって pDNA が内封化されることを報告するとともに、これが pDNA の安定化、複合体の細胞表面への吸着および内在化において重要な性質であると考察している (39)。Huang らも DC-chol/DOPE リボソームを用いた検討において、電荷比+1.2 の複合体では DNA 鎖が脂質膜に覆われる構造 (spaghetti-like structure) を示し、またこの構造が細胞内取り込みや pDNA の安定化において重要であると考察している (40)。

これまで高い電荷比の複合体ではその細胞毒性により遺伝子発現効率が減少することが報告されてきたが (30, 31)、これらの報告では今回より極めて高濃度のカチオン性リボソームを細胞に添加しており、今回実験に用いた濃度ではマウスマクロファージ細胞株 RAW264 以外、顕著な細胞毒性は認められなかった。この結果は今回の実験条件においては複合体の細胞毒性が遺伝子発現効率における最適電荷比を決める要因とはならないことを示唆している。また RAW264 では複合体の細胞取り込み実験においてマクロファージ本来の高い貪食能により高い取り込み量を示したが、全ての電荷比において遺伝子発現効率は低かった。これは従来マクロファージは遺伝子導入しにくいこと (41)、カチオン性脂質に対し感受性が高いこと (42) が報告されていることから、MTT assay の結果が示すように複合体に含まれるカチオン性脂質がマクロファージに対して高い細胞毒性を示したものである。

複合体の細胞取り込みに関しては全ての細胞において電荷比の上昇とともに値が上昇した。これは複合体の正電荷と細胞表面の負電荷との間の静電的相互作用により複合体が細胞表面に吸着することから、電荷比の増加に伴い複合体の表面電荷が上昇し細胞表面に吸着しやすくなったこと、また複合体の粒子径の減少により細胞内に内在化されやすくなったものと思われる。複合体の細胞内取り込みが遺伝子発現効率を決める律速段階となっているという報告もあるが (43)、今回の検討においては細胞内取り込み量と遺伝子発現効率は完全には対応していなかったことから、細胞内取り込み量の違いだけでは各電荷比の遺伝子発現効率の違いを説明できないことが明らかとなった。

複合体を培養細胞の核に直接マイクロインジェクションしてもほとんど遺伝子発現を示さない

ことから (32)、細胞内に内在化を受けた複合体が遺伝子発現を示すには pDNA が脂質成分から分離する必要があると考えられている。またカチオン性リボソームは内在化後エンドソーム膜と融合すること (44)、エンドソーム膜の崩壊と遺伝子発現効率に比例関係が認められること (37) から、複合体がエンドソーム膜と融合することで静電的中和が起これ、それによって pDNA は複合体から分離し細胞質内に放出されると考えられている。そこで Szoka らの方法に従い (33)、負電荷リボソームをエンドソーム膜のモデルとして用いて電荷比の異なる複合体からの pDNA 放出を検討した。その結果、高電荷比の複合体では低電荷比の複合体に比べ、pDNA の放出においてより多くの負電荷を必要とすることが明らかとなった。これは高電荷比の複合体では静電的中和が十分に起こらず、pDNA の放出が制限されている可能性を示唆している。

そこで蛍光標識 pDNA/rhodamine 標識カチオン性リボソーム複合体を調製し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて細胞内での pDNA の放出挙動を観察した。HUVEC 細胞に複合体を添加し 4 時間後細胞を固定して観察したところ、電荷比+1.12、+2.24 とともにほとんどの pDNA は脂質成分とともに顆粒状に存在した。しかし電荷比+1.12 においては一部 pDNA が脂質成分から分離し、細胞内に拡散している様子が認められた。一方で電荷比+2.24 においては、そのような様子は観察されず、全てが脂質成分とともに顆粒状に存在していた。これは本章 3-b の結果とよく対応するものであり、低電荷比では高電荷比の複合体に比べ、複合体からの pDNA の放出が容易に起こることを示唆している。この pDNA の放出過程においてはエンドソーム膜上の負電荷量が重要であると考えられるが、細胞膜上の負電荷量が細胞の種類により異なることから (45)、エンドソーム膜上の負電荷量においても細胞により違いがあるものと考えられる。よってエンドソーム膜上の負電荷量の違いによって遺伝子発現における最適電荷比が異なる可能性が示唆された。

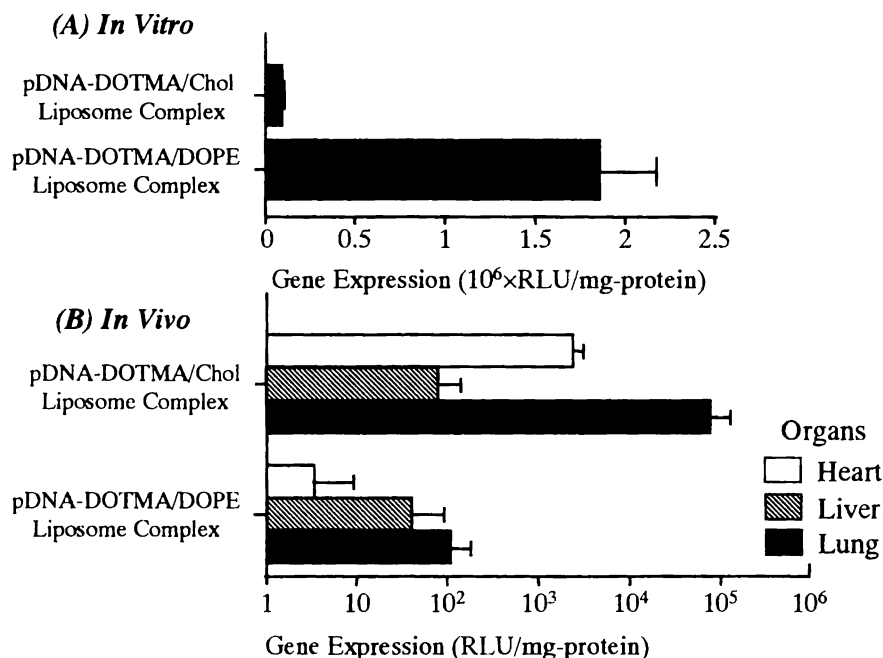
またこの pDNA の放出に関しては複合体の粒子径や構造も非常に重要であると思われる。粒子径 1  $\mu\text{m}$  の polystyrene beads ではエンドソームからライソゾームへの移行が遅れることから (29)、比較的大きな粒子径を持つ電荷比+1.12 の複合体においても同様にライソゾームへの移行が遅れ pDNA 放出の機会が増加したことが予想される。また AFM を用いた検討において高い電荷比の複合体では pDNA が凝縮し非常にコンパクトな構造をとっていることが明らかとなった。Fasbender らは、中性脂質 DOPE の各種誘導体を用いた検討で複合体が凝縮した構造をとることで pDNA の細胞質への放出が減少し、遺伝子発現効率が減少することを報告している (46)。また Wheeler らはカチオン性脂質 DMR1E を含む複合体が $\beta$ AE-DMR1E を含む複合体に比べ、凝縮した構造を持ち、遺伝子発現効率もそれに応じて減少することを報告している (47)。よって今回の検討においても複合体が凝縮した構造をとることによって pDNA の複合体からの放出が減少した可能性があると思われる。

以上、本章では各種培養細胞を用いて電荷比の異なる pDNA/カチオン性リボソーム複合体の物理化学的性質と遺伝子発現効率の関連について検討した。その結果、複合体の粒子径および表面電荷や構造は電荷比によって著しく変化することが明らかとなった。さらにそれらが複合体の細胞内取

り込みや細胞内動態、遺伝子発現効率に大きな影響を及ぼすこと、また細胞内における pDNA の複合体からの放出が複合体による遺伝子発現効率の最適電荷比を決める重要な段階であることが明らかとなった。これらの知見はカチオン性リボソームを用いた遺伝子導入メカニズムの解明のみならず、遺伝子治療における複合体設計および最適化に向けて有益な情報を与えるものと思われる。

## 第II章 プラスミドDNA/カチオン性リポソーム複合体の物理化学的性質と静脈内投与時の遺伝子発現効率の関連

前章では、全ての複合体が標的細胞に直接結合できる条件である *in vitro* 遺伝子導入において、複合体が培養細胞に取り込まれた後エンドソーム膜との融合によって pDNA が複合体から放出される過程が重要であることを明らかにした。この過程においては、中性脂質 DOPE が中心的な役割を果たしていると考えられる (17, 30, 35)。DOPE は、小さな親水基と嵩高い疎水基を持つ特殊な形状をしているためそれ自身膜融合を促進する能力があることが知られている (48)。また Koltover らは DOPE を用いることで複合体中の脂質成分がヘキサゴナル構造をとり、負電荷リポソームと融合することで DNA を放出することを報告している (49)。よって DOPE を膜融合能を持たない 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine (DOPC) に置換すると遺伝子発現効率が大きく減少する (17, 35)。したがって培養細胞用遺伝子導入試薬として既に市販されているカチオン性リポソームにはほとんど DOPE が含まれており、また *in vivo* 遺伝子導入においても、複合体を気道内投与もしくは腹腔内投与した場合には DOPE を含むカチオン性リポソームを用いることで高い遺伝子発現効率および治療効果が得られている (50-53)。しかし DOPE を組み込んだカチオン性リポソームからなる複合体を静脈内投与した場合、各臓器で極めて低い遺伝子発現しか認められない (Fig. 12)。これは DOPE を含む複合体が強い正電荷を帯びているために静脈内投与後、標的細胞に到達する以前に血清タンパクや血球細胞といった負電荷を持つ生体成分と静電的相互作用することによって、遺伝子導入能力を失ってしまうことを示唆している。よって静脈内投与による *in vivo* 遺伝子治療実



**Fig. 12 *In vitro* and *in vivo* transfection efficiency of pDNA-cationic liposome complexes with different neutral lipids.** (A) *In vitro* transfection efficiency. HUVEC cells were transfected with pDNA-cationic liposome complexes at +1.12. (B) *In vivo* transfection efficiency. pDNA-cationic liposome complexes at +2.24 were intravenously injected into mice.

現のためには血中において血液成分と相互作用しても遺伝子導入能力を失うことなく遺伝子を標的部位に送達できるキャリアーが必要不可欠であり、そのためには血液成分との相互作用に関する検討が必要であると思われる。

一方で近年、中性脂質として DOPE の代わりに Cholesterol (Chol) を用いることで静脈内投与後全身の各臓器で高い遺伝子発現が得られることが報告されている (54-58)。従来 Chol はリボソームの構成脂質成分として頻繁に用いられており、Chol を組み込むことによりリボソームの安定性が向上すること (59-61)、また Chol を含むリボソームは静脈内投与後高い血中滞留性を示すこと (62, 63) が報告されている。中性脂質として Chol を用いた場合においても DOPE を用いた場合と同様、複合体は強い正電荷を持ち血液成分と静電的相互作用を起こすことが予想されるが、Chol を含む複合体は DOPE を含む複合体に比べ血清タンパクとの相互作用に対して高い安定性を示すことが報告されている (64, 65)。しかしながら、Chol を含む複合体が静脈内投与後高い遺伝子発現を示す機構に関しては不明な点も多く、Chol を含む複合体と DOPE を含む複合体の物理化学的性質や構造の違いや、血球成分との相互作用に関してはほとんど報告がない。またそれらと遺伝子発現効率との関連についてもほとんど検討された例がないのが現状である。

また血液成分との相互作用は複合体の静脈内投与後の体内動態にも大きな影響を及ぼすと思われる。複合体は静脈内投与後、最初の通過臓器である肺に集積することが報告されている (57, 65-68)。現在複合体が静脈内投与後、血清タンパクとの相互作用により凝集し肺の毛細血管に塞栓するのではないかと考えられているが、血液成分との相互作用が複合体の肺への集積にどのように関連しているか、明確なメカニズムは明らかにされていない。

そこで本章では標的細胞に到達する以前の生体成分との相互作用が複合体の遺伝子導入能力および体内動態に及ぼす影響について明らかにすることを目的に、既に静脈内投与後高い遺伝子発現を示すことが知られている pDNA-DOTMA/Chol リボソーム複合体 (DOTMA/Chol 複合体) と、*in vitro* 実験系においては高い遺伝子発現を示すものの静脈内投与後はほとんど遺伝子発現を示さない pDNA-DOTMA/DOPE リボソーム複合体 (DOTMA/DOPE 複合体)、中性脂質を含まない pDNA-DOTMA リボソーム複合体 (DOTMA 複合体) を選択し、各複合体の物理化学的性質や構造を検討した。さらに血液成分との相互作用や遺伝子発現効率との関連について検討するとともに、静脈内投与による遺伝子導入においてどのような物性および構造が重要であるか考察した。またラット肺灌流法を用いて、血液成分との相互作用が複合体の肺への集積に及ぼす影響についても検討した。

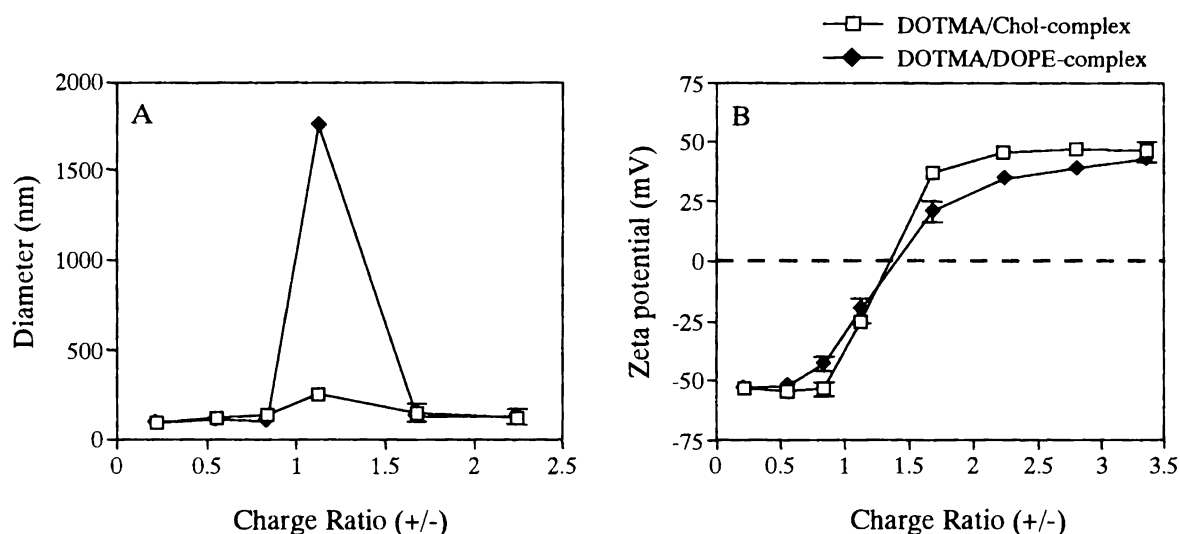
## II - 1 DOTMA/Chol 複合体、DOTMA 複合体および DOTMA/DOPE 複合体の物理化学的性質

Chol は脂質二重膜に組み込まれることで、不飽和脂肪酸を持つ Phosphatidylcholine (PC) からなる脂質膜の流動性を低下させる一方、飽和脂肪酸を持つ PC から構成される膜の流動性を上昇させ

るなど、Chol は膜の性質に大きな影響を及ぼすことが知られている (69)。よって DOPE の代わりに Chol をカチオン性リボソームに組み込むことによって、複合体の構造および物理化学的性質も大きく変化することが予想される。そこで第 I 章と同様複合体の種々の物理化学的性質および構造について検討した。

### 1-a 複合体の粒子径およびゼータ電位

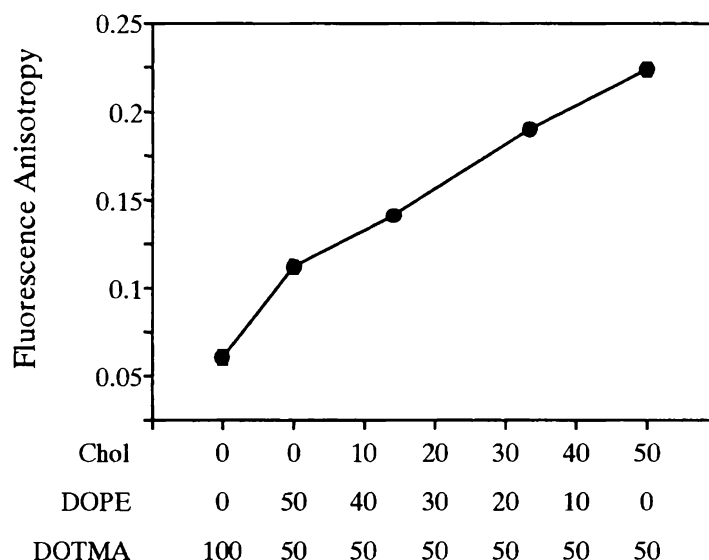
まずカチオン性リボソーム単独の粒子径は DOTMA/Chol リボソーム、DOTMA/DOPE リボソームともに 100 nm、ゼータ電位に関しては DOTMA/Chol リボソームが +49 mV、DOTMA/DOPE リボソームが +44 mV であった。第 I 章で示したように DOTMA/DOPE 複合体の粒子径は電荷比により大きく変化し、電荷比 +1 付近では粒子径の増大が認められた (Fig. 13A)。一方で DOTMA/Chol 複合体では、電荷比 +1 付近で若干の粒子径の増大が見られたものの全ての電荷比において著しい変化は認められなかった。ゼータ電位に関しては両複合体とも同様の変化を示し、電荷比 +1.67 以上で正電荷を示し、電荷比 +2.8 以上でリボソーム単独とほぼ同じ値を示した (Fig. 13B)。しかしながら粒子径およびゼータ電位ともに両複合体間に大きな違いは認められず、今回 *in vivo* 実験に用いた電荷比 +2.24 においては両複合体とも粒子径約 120 nm、ゼータ電位約 +40 mV であった。



**Fig. 13 The particle size (A) and zeta potential (B) of DOTMA/Chol- and DOTMA/DOPE-complex at various charge ratios.** The particle size and zeta potential were plotted as a function of the charge ratio.

### 1-b 蛍光偏向解消法を用いたカチオン性リボソームの膜流動性の検討

前節の検討においては両複合体間に大きな違いが認められなかったことから、さらに詳細な複合体の物性および構造解析を行った。Chol は不飽和脂肪酸を持つリン脂質からなる脂質二重膜に組み

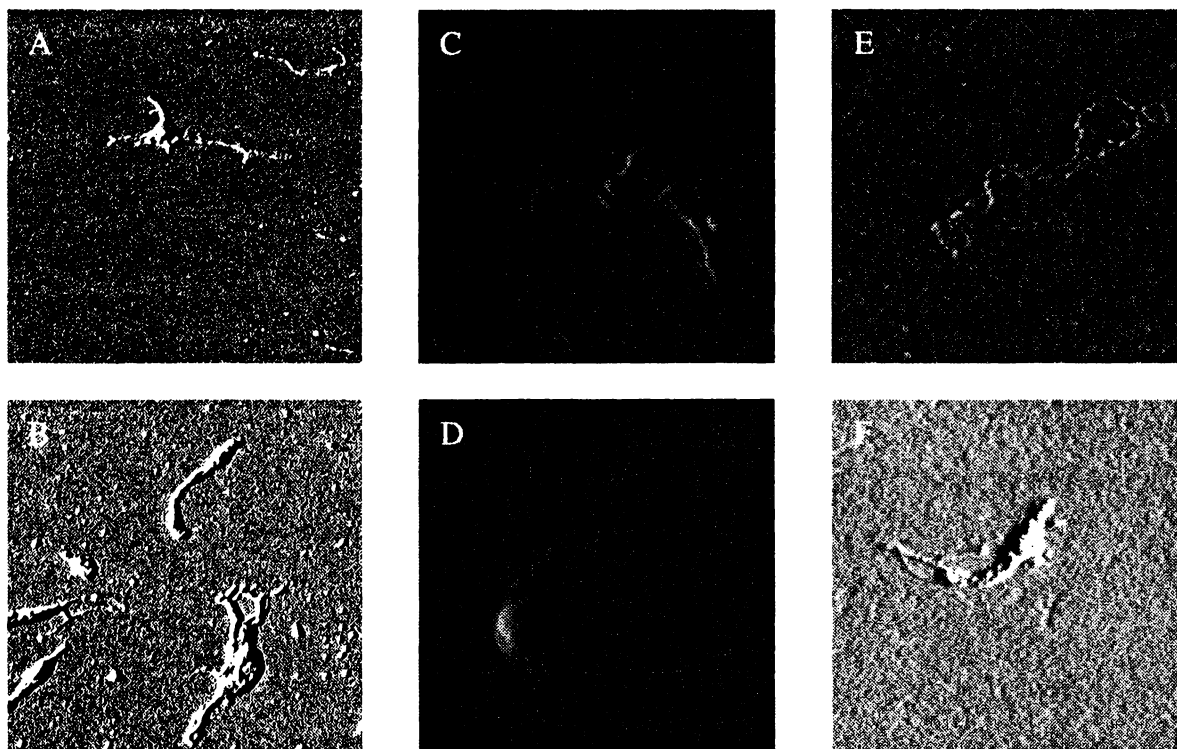


**Fig. 14 Fluorescence anisotropy of DPH in DOTMA/DOPE/Chol liposomes at 37 °C.** The liposomes were labeled with 0.5 % 1,6-Diphenylhexatriene (DPH). Liposome suspensions (20  $\mu$ M of total lipids) were stirred with a magnetic stirrer during measurements.

込まれることで膜流動性を低下させることが知られている。そこで蛍光物質 DPH をリボソーム膜に組み込み、蛍光偏向解消法を用いて今回用いたカチオン性リボソームの膜流動性について検討した。その結果、中性脂質を含まないリボソームでは最も低い値を示し、最も高い流動性を持つことが示された (Fig. 14)。これは DOTMA 分子同士の静電的反発によるものと考えられる。また Chol 含有量が増加するにつれて蛍光異方性の上昇が観察された。よって遺伝子導入用カチオン性リボソームにおいても、Chol 添加によって膜の流動性が低下することが示された。

### 1 -c 原子間力顕微鏡による複合体の構造の観察

第 I 章と同様に原子間力顕微鏡を用いて複合体の構造を検討したところ、DOTMA/Chol 複合体は電荷比+1.12、+2.24 とともに類似した構造を示した。pDNA は脂質成分に完全に覆われており、pDNA に由来するループ鎖は観察されなかった (Fig. 15A, B)。また複合体表面は比較的なだらかであった。しかしながら複合体の高さには両電荷比で違いが見られ、電荷比+2.24 では+1.12 に比べ明らかに高く、その高さは検出限界の 10 nm 以上であった。中性脂質を含まない DOTMA 複合体に関しても DOTMA/Chol 複合体と同様の構造が観察された (Fig. 15C, D)。一方 DOTMA/DOPE 複合体においては pDNA は大部分が脂質成分によって覆われているものの、電荷比+2.24 においても pDNA に由来するループ鎖が観察された (Fig. 15E, F)。また複合体の高さは DOTMA/Chol 複合体と比べると、約 2 nm と低いものであった。

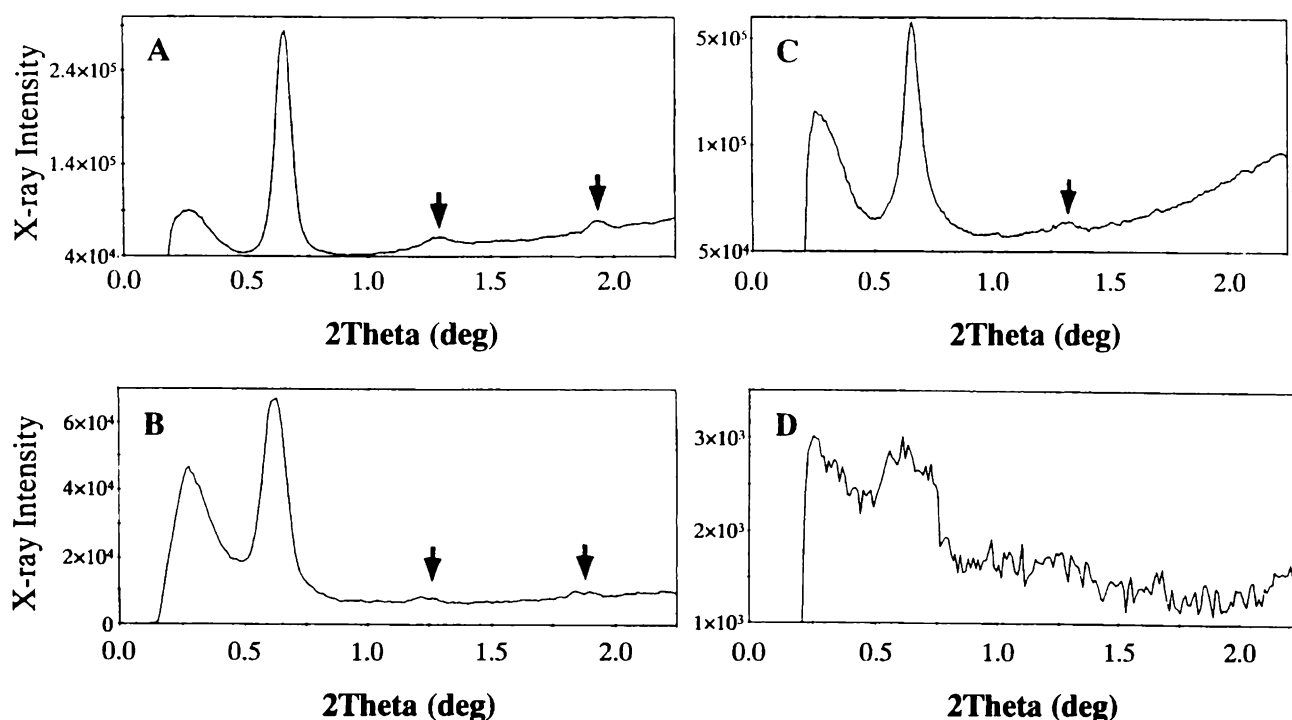


**Fig. 15 Atomic force microscopic images of DOTMA/Chol-, DOTMA- and DOTMA/DOPE-complex.** (A) DOTMA/Chol-complex (Charge ratio +1.12), (B) DOTMA/Chol-complex (+2.24), (C) DOTMA-complex (+1.12), (D) DOTMA-complex (+2.24), (E) DOTMA/DOPE-complex (+1.12), (F) DOTMA/DOPE-complex (+2.24). The size of all panels is  $1 \times 1 \mu\text{m}$ . The panels shown are typical of the results of multiple evaluations.

#### 1-d X線小角散乱法による複合体の構造の検討

さらに X 線小角散乱法 (SAXS) を用いて詳細な複合体の構造を解析した。まず電荷比+1.12 では両複合体とも脂質成分がラメラ構造を持つことを示唆するピークが観察された (Fig. 16A, B)。DOTMA/Chol 複合体および DOTMA/DOPE 複合体の一次 Bragg Peak はそれぞれ  $1.29^\circ$ 、 $1.31^\circ$  であった。この値より Bragg equation を用いて計算されるラメラ構造の周期性は DOTMA/Chol 複合体で 6.83 nm、DOTMA/DOPE 複合体では 6.73 nm であった。電荷比+2.24 の DOTMA/Chol 複合体では+1.12 と同様にラメラ構造に起因する強いピークが認められた (Fig. 16C)。しかし電荷比+2.24 の DOTMA/DOPE 複合体では明確なピークは認められず、また X 線の散乱強度も非常に弱いものであった (Fig. 16D)。この結果から電荷比+2.24 の DOTMA/DOPE 複合体では DOTMA/Chol 複合体とは異なり、脂質成分の流動性が高く不安定な構造をとっていることが示唆された。





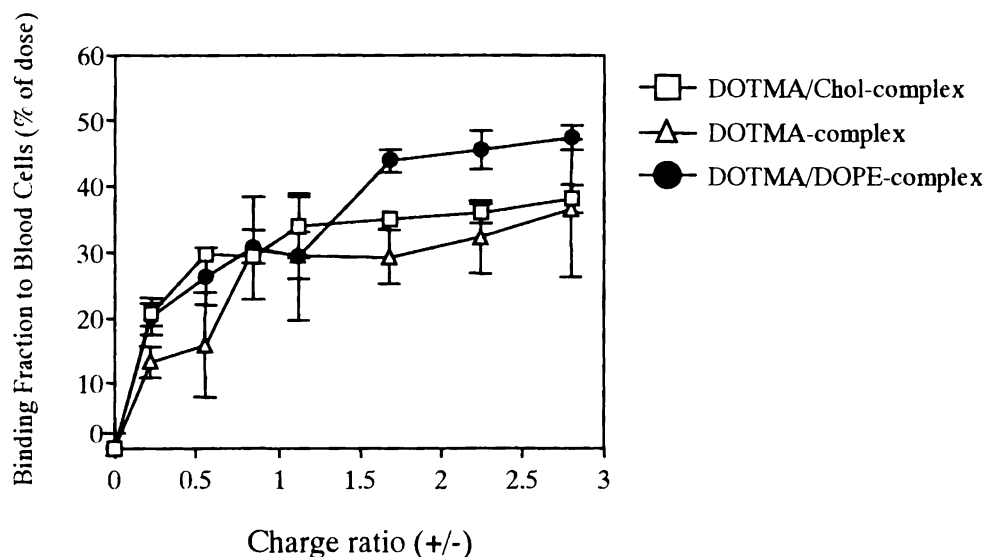
**Fig. 16 SAXS patterns of DOTMA/Chol- and DOTMA/DOPE-complex.** Arrows indicate the peaks of the second- and third-order reflections. (A) the pattern of DOTMA/Chol-complex (charge ratio +1.12). DOTMA/Chol-complex exhibited three peaks at  $2\theta=1.29^\circ$ ,  $2.60^\circ$ , and  $3.07^\circ$ , indicating a lamellar structure. (B) the pattern of DOTMA/DOPE-complex (+1.12). DOTMA/DOPE-complex exhibited two peaks at  $2\theta=1.31^\circ$  and  $2.65^\circ$ , indicating a lamellar structure. (C) the pattern of DOTMA/Chol-complex (+2.24). Three peaks were observed, indicating a lamellar structure. (D) the pattern of DOTMA/DOPE-complex (+2.24). A very diffuse and weak reflection was observed.

## II - 2 複合体と血球成分との相互作用

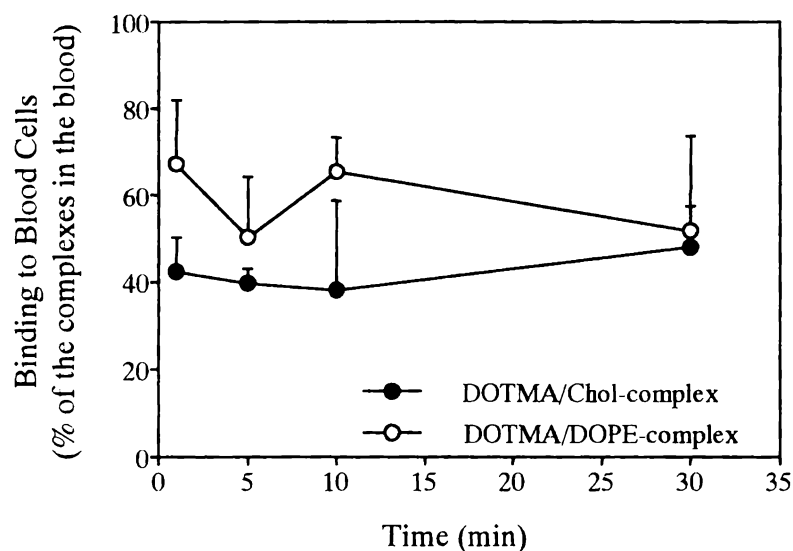
両複合体とも強い正の表面電荷を持つことから、静脈内投与後直ちに負電荷を持つ血清タンパクや血球成分と静電的に結合することが予想される。しかしこれまで血清タンパクとの相互作用についてはいくつか報告があるものの、血球成分との相互作用についてはほとんど報告がない。血液の約半分は血球成分に占められているとともに、赤血球をはじめとする血球成分も負電荷を有するため、複合体は静脈内投与後血球成分とも相互作用すると考えられ、その相互作用も遺伝子発現効率を左右する大きな要因であると思われる。そこで複合体と血球成分との相互作用について検討した。

### 2 - a 複合体の血球成分への結合

まず複合体が全血と混合した際、どの程度血球成分と結合するか、 $^{32}\text{P}$  放射標識 pDNA を用いて検討した。マウス全血と複合体を混合したのち、血漿画分に検出された放射活性を全放射活性から



**Fig. 17** *In vitro* binding to blood cells of DOTMA/Chol-, DOTMA- and DOTMA/DOPE-complex at various charge ratios. Twenty  $\mu$ l of the complexes was mixed with 100  $\mu$ l mouse whole blood and the mixtures were then incubated for 3 min. After incubation, the samples were centrifugated and the plasma from the samples was collected and the radioactivity was measured. The hematocrit of mouse blood was assumed to be 47 %. The fractions of the complexes binding to blood cells were estimated by subtracting the radioactivity of the plasma fraction from the total radioactivity.



**Fig. 18** *In vivo* binding to blood cells of DOTMA/Chol- and DOTMA/DOPE-complex at +2.24 after intravenous injection. The complexes were intravenously injected into mice at a dose of 25  $\mu$ g DNA per mouse. At the indicated time, mice were sacrificed and the blood was collected from vena cava. The radioactivities in the blood and plasma fractions were measured by scintillation counter. The hematocrit of mouse blood was assumed to be 47 % and the fractions of the complexes binding to blood cells were estimated by subtracting the radioactivity of the plasma fraction from the radioactivity of the blood fraction.

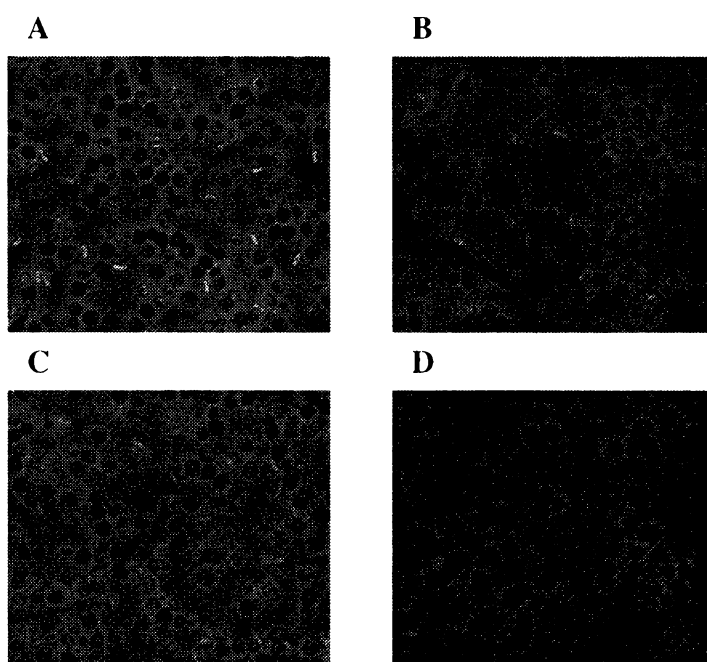
差し引くことで血球成分に結合した複合体量を算出した。その結果、全ての複合体とも電荷比の上昇に伴い、血球成分への結合量は増加した (Fig. 17)。後述する静脈内投与による遺伝子導入実験において用いた電荷比+2.24 においては、DOTMA/Chol 複合体で 36 %、DOTMA 複合体で 35 %、

DOTMA/DOPE 複合体で 44 %が血球成分に結合していた。DOTMA/DOPE 複合体が若干高い結合量を示したものの、全ての電荷比において各複合体間に大きな違いは認められなかった。

さらに *in vivo* においても同様に血球成分への結合が起こるか検討した。<sup>32</sup>P 放射標識プラスミド DNA を用いて複合体を調製し、マウスに尾静脈内投与した。経時的にマウスを屠殺し、血中および血漿中の放射活性を測定することで血球成分に結合した複合体量を算出した。その結果、投与 1 分後から 30 分後まで血中に存在する複合体のうち、DOTMA/Chol 複合体では約 40 %、DOTMA/DOPE 複合体では約 60 %が血球成分に結合していることが明らかとなった (Fig. 18)。

## 2-b 複合体と赤血球との相互作用

前節において各複合体とも約半分が血球成分に結合するものの、その結合量に大きな違いが見られなかったことから、血球成分の大部分を占める赤血球を分離して赤血球懸濁液を調製し、複合体との相互作用を顕微鏡下観察した。10 分間のインキュベーション後、DOTMA/Chol 複合体、DOTMA 複合体と混合した赤血球ではほとんど変化は認められなかった (Fig. 19B, C)。しかし DOTMA/DOPE 複合体と混合した赤血球では、赤血球同士の融合および凝集が観察された (Fig. 19D)。この融合の程度は時間の経過とともに増大した。高濃度の赤血球懸濁液を用いた場合には、短いインキュベーション時間で融合が観察され、また希釈したマウス全血を用いて同様の実験を行った場合においても、DOTMA/DOPE 複合体で赤血球同士の融合が観察された。



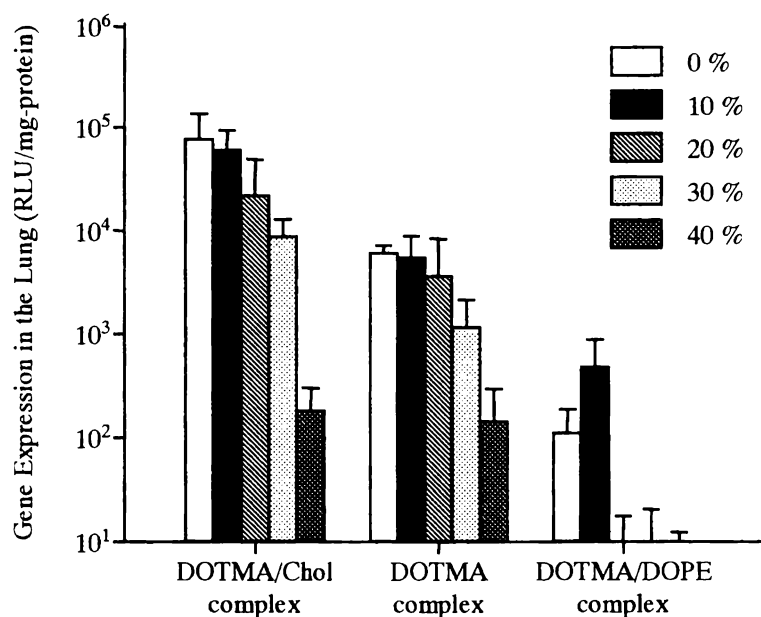
**Fig. 19 Erythrocyte-erythrocyte fusion induced by the complexes.** Six hundred microliters of erythrocyte suspension (hematocrit 0.1%) was incubated with 50  $\mu$ l of the complexes (+2.24, 0.125  $\mu$ g plasmid DNA/ $\mu$ l) for 10 min. (A) untreated erythrocytes, (B) erythrocytes incubated with DOTMA/Chol-complexes, (C) erythrocytes incubated with DOTMA-complexes, (D) erythrocytes incubated with DOTMA/DOPE-complex.

## II-3 複合体による静脈内投与後の *in vivo* 遺伝子発現

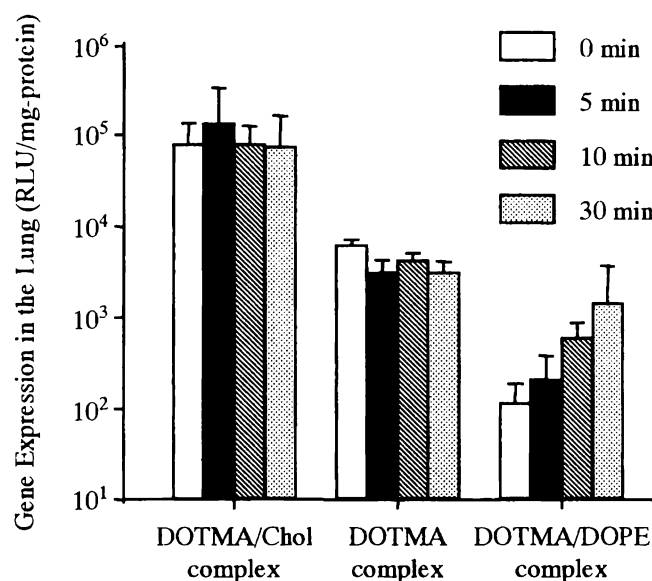
既に幾つかのグループによって報告されているように、DOTMA/Chol 複合体は DOTMA/DOPE 複合体と比較し、静脈内投与後各臓器、特に肺で高い遺伝子発現を示すことが知られている (54-58)。そこで血液成分との相互作用と複合体の遺伝子発現効率との関連について検討するため、静脈内投与前に複合体を赤血球懸濁液もしくは血清とあらかじめインキュベートし、静脈内投与後の肺での遺伝子発現効率を評価した。

### 3-a 赤血球との相互作用が静脈内投与後の遺伝子発現効率に及ぼす影響

まず各濃度の赤血球懸濁液を調製し、各複合体と 5 分間インキュベートした後、マウスに静脈内投与し、肺における遺伝子発現効率を評価した。その結果、各複合体とも赤血球濃度依存的に肺における遺伝子発現効率は減少していった (Fig. 20)。しかしながら、各複合体間を比較すると、DOTMA/Chol 複合体、DOTMA 複合体では赤血球濃度の上昇とともに遺伝子発現効率の緩やかな減少を示したのに対し、DOTMA/DOPE 複合体では明らかな減少が認められ、さらに赤血球濃度 20 % 以上においてはほとんど遺伝子発現が見られなかった。また肺以外の各臓器においても赤血球濃度 20 % 以上においては全く遺伝子発現が見られなかった。



**Fig. 20** *In vivo* gene expression with DOTMA/Chol-, DOTMA- and DOTMA/DOPE-complex at +2.24, pre-incubated with mouse erythrocyte suspensions at different concentrations for 5 min. The complexes were mixed with mouse erythrocyte suspensions at the indicated concentrations and the mixtures were incubated for 5 min at 37°C. After incubation, erythrocyte-treated complexes were injected i.v. into mice at a dose of 25 µg DNA per mouse. Twenty-four hours after injection, the mice were sacrificed and luciferase activity was determined.



**Fig. 21** *In vivo* gene expression with DOTMA/Chol-, DOTMA- and DOTMA/DOPE-complex at +2.24, pre-incubated with mouse serum for the indicated times. The complexes were mixed with mouse serum and the mixtures were then incubated at 37°C. At the indicated times following incubation, serum-treated complexes were injected i.v. into mice at a dose of 25 µg DNA per mouse. Twenty-four hours after injection, the mice were sacrificed and luciferase activity was determined.

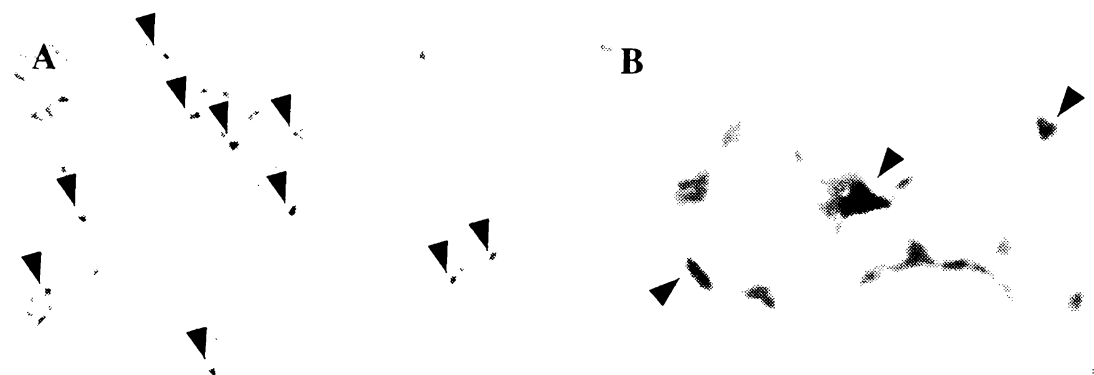
### 3-b 血清タンパクとの相互作用が静脈内投与後の遺伝子発現効率に及ぼす影響

一方の血液成分である血清に関しては、複合体との相互作用についていくつか報告があり、複合体が補体を活性化すること (70) や血中で血清タンパクと結合すること (64, 65) などが報告されている。そこで血清を用いて同様の実験を行った。マウス血清と複合体を混合し、37°Cにてインキュベーションした後マウスに静脈内投与した。Fig.21 に示すように、各複合体ともインキュベーション時間を 30 分まで延長しても遺伝子発現効率の減少は認められなかった。よって血清タンパクとの相互作用は複合体の遺伝子導入能力に赤血球ほど影響を及ぼさないことが示唆された。また DOTMA/DOPE 複合体に関してはインキュベーション時間の延長に伴い、遺伝子発現効率の増加が観察された。これは血清タンパクが複合体の表面に静電的に結合することによって表面電荷が低下し、赤血球との相互作用が減少したためと思われる。

### 3-c 静脈内投与後の肺における遺伝子発現細胞の同定

次にβ-galactosidase 発現プラスミドベクターを用いて肺における遺伝子発現細胞の同定を行った。投与より 6 時間後、肺組織を取り出しクリオスタットを用いて新鮮凍結切片を作成した。その後 X-gal 試薬を用いて遺伝子発現細胞を染色した。その結果、遺伝子発現細胞は肺組織全体にわたって認められ、主に血管内皮細胞と思われる細胞において遺伝子発現が見られた (Fig. 22)。またコントロールとして 5 %デキストロース溶液を投与した群においてはほとんど染色された細胞は認

められなかった。



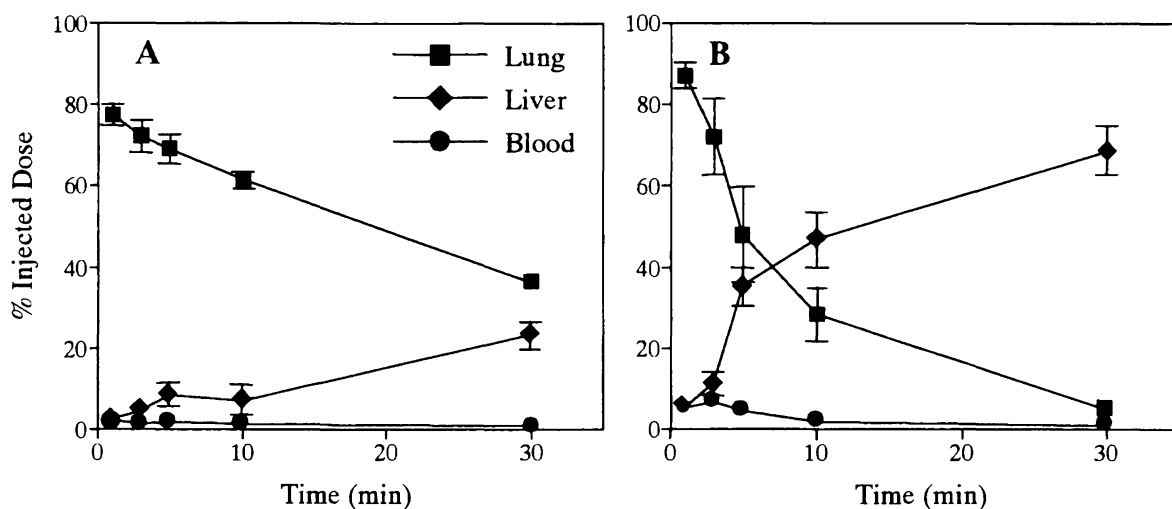
**Fig. 22  $\beta$ -galactosidase staining microphotograph of the lung section after intravenous injection of plasmid DNA-DOTMA/Chol liposome complex containing pCMV-LacZ in mice.** Plasmid DNA (50  $\mu$ g) was complexed with DOTMA/Chol-liposome at a charge ratio of +2.24.  $\beta$ -galactosidase activity was determined 6 h after injection. Original magnification,  $\times 100$  (A) and  $\times 200$  (B).

#### II-4 静脈内投与後の複合体の体内動態

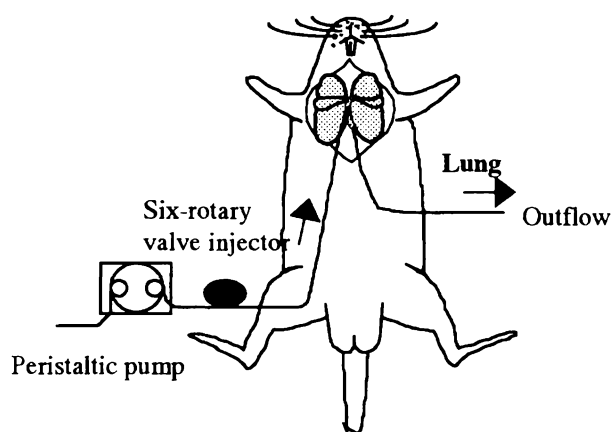
本章II-2に示したような血液成分との相互作用の違いは、体内動態にも大きな影響を及ぼすと思われる。そこで $^{32}\text{P}$ 放射標識 pDNA を用いて静脈内投与後の DOTMA/Chol 複合体、DOTMA/DOPE 複合体の体内動態を検討した。その結果、Fig. 23 に示すように、両複合体とも静脈内投与後速やかに血流から消失し、最初の通過臓器である肺に高い集積を示した（投与量の約 80 %）。しかし DOTMA/DOPE 複合体は投与直後肺に高い集積を示したものの、その後徐々に肺から消失していき、投与 30 分後ではほとんど肺には滞留していなかった。一方で徐々に肝臓に集積していき、投与 30 分後では約 70 %が集積していた。DOTMA/Chol 複合体は比較的長時間肺に滞留しており、投与 30 分後で投与量の約 40 %が肺に滞留していた。また両複合体とも肺、肝臓以外の臓器への集積はほとんど認められなかった。

#### II-5 ラット肺灌流法を用いた複合体の肺への集積に及ぼす血液成分の影響

両複合体とも静脈内投与後、速やかに肺に高い集積を示した。しかしその後の肺での滞留性においては両者に違いがあることが判明した。複合体は血清タンパクとの相互作用により凝集体を形成し肺の毛細血管に塞栓を起こすことが報告されている（65, 71）ことから、肺における滞留性の違いは血液成分との相互作用の違いによる可能性が考えられる。そこで血液成分との相互作用が複合体の肺への集積に及ぼす影響を、ラット肺灌流法を用いて検討するとともに、複合体の肺への集積メカニズム解明を試みた。



**Fig. 23** *In vivo* distribution of (A) DOTMA/Chol- and (B) DOTMA/DOPE-complex at a charge ratio of +2.24 after intravenous injection. Groups of three mice received i.v. injections of the complexes at a dose of 25  $\mu$ g DNA per mouse. The results are expressed as a percentage of the injected dose per organ.



Male Wistar Rat (180-200g)

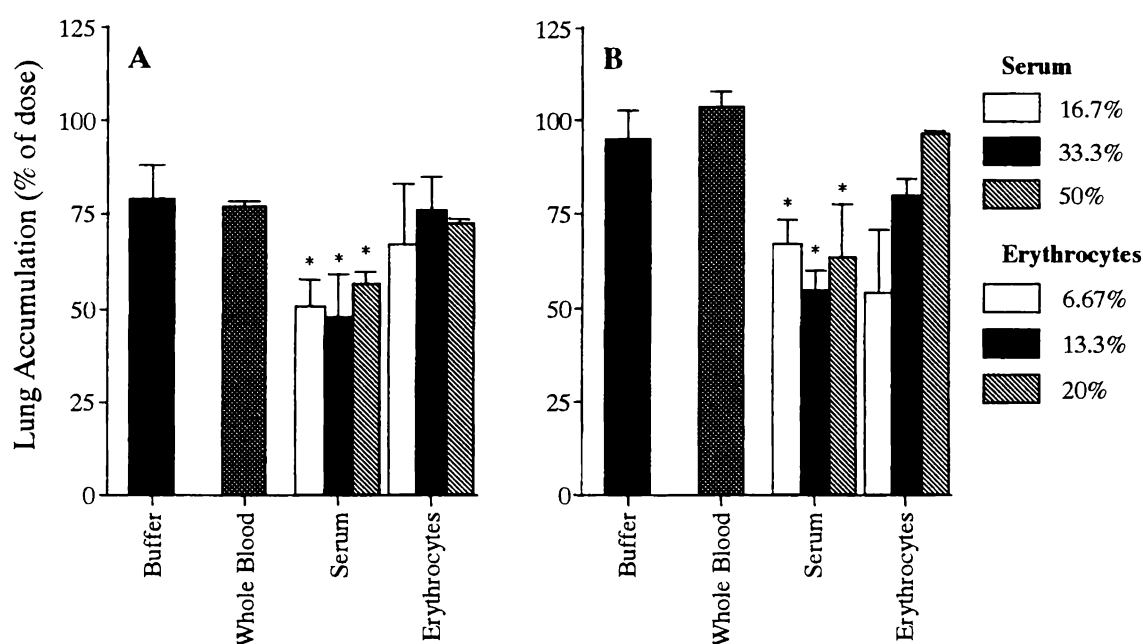
**Fig. 24** Diagram of single-pass rat lung perfusion experimental system.

## 5 - a 血液成分との相互作用が肺への集積に及ぼす影響

灌流実験系は全身から特定の臓器のみを単離しその血管系を灌流するものであり、*in vivo*での組織環境を維持したまま *in vivo*とは異なった任意の条件で実験できる系として極めて有用である。そこで本実験においては複合体を灌流前に5分間ラット全血、ラット血清および赤血球懸濁液とインキュベートし、六方バルブインジェクターを用いて灌流系に矩形注入した (Fig. 24)。5分間灌流の後、肺を摘出し複合体の集積量を測定した。まず Buffer のみとプレインキュベーションした場合、DOTMA/Chol 複合体はその約 75 %が肺に集積した (Fig. 25A)。これは複合体が血管内皮細胞に静電的に吸着したものと思われる。しかしラット全血とプレインキュベーションした場合においても

肺への集積量に有意な変化は認められなかった。そこで血液成分のうち、どの成分が複合体の肺への集積に重要であるか検討するため、複合体を血清もしくは赤血球懸濁液と混合し灌流系に注入した。まず血清とブレインキュベートした場合、肺への集積量は約 45 %に減少した。これは検討した全ての血清濃度において同程度の値を示した。次に赤血球懸濁液とブレインキュベートした場合、複合体は全血とブレインキュベートした場合と同様、約 75 %が肺に集積した。これは検討した全ての赤血球濃度において同程度の値を示した。

DOTMA/DOPE 複合体についても同様の実験を行った (Fig. 25B)。DOTMA/Chol 複合体と同様に、ラット全血もしくは Buffer とブレインキュベートした場合、非常に高い肺への集積を示した (投与量の 90 %)。しかし血清とのブレインキュベーションにおいて、有意な集積量の減少が認められた。また赤血球懸濁液とブレインキュベーションした場合、肺への集積量は赤血球の濃度依存的であり、赤血球濃度の上昇に伴い集積量も増加していった。



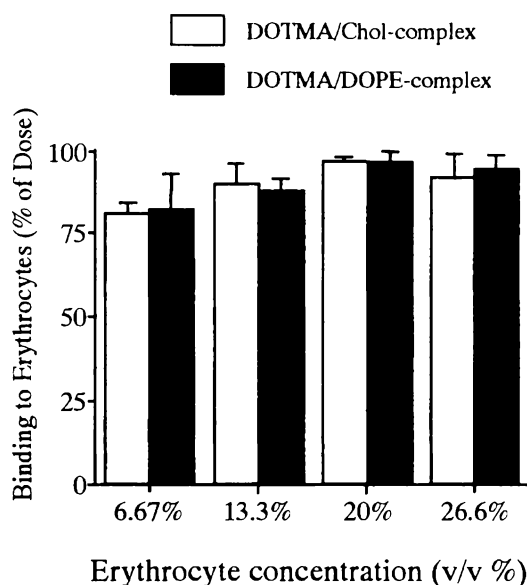
**Fig. 25 Effects of blood components on the lung accumulation (A) DOTMA/Chol- and (B) DOTMA/DOPE-complex after lung perfusion.** Both complexes were mixed with whole blood at a 2:1 (v/v) ratio, and mixed with rat serum or erythrocyte suspensions to give the final % concentration indicated. The mixtures were then incubated for 5 min. After perfusion, the whole lungs were excised and the radioactivities were measured. There are statistically significant differences by ANOVA: \*,  $P < 0.01$  (versus whole blood).

## 5 -b 灌流時における複合体の赤血球への結合

灌流前に赤血球懸濁液とインキュベートした複合体が肺に集積したことから、赤血球懸濁液とインキュベートすることで複合体がどの程度赤血球に結合するか検討した。その結果、両複合体とも全ての赤血球濃度において 80 %以上が赤血球に結合していた (Fig. 26)。よって本章 5 -a におい



て赤血球懸濁液とブレインキューベーションした複合体が高い集積量を示したが、これは灌流前の時点で赤血球に結合していた複合体が肺に集積したことを示している。



**Fig. 26 Binding of the complexes to erythrocytes after a 5 min incubation with erythrocyte suspensions at various concentrations.** The complexes containing  $^{32}\text{P}$ -labeled plasmid DNA were mixed with erythrocyte suspensions. The mixtures were centrifuged after a 5 min incubation and the radioactivities in the supernatants were measured. The fractions of the complexes binding to blood cells were estimated by subtracting the radioactivities of the supernatants from the total radioactivities.

#### 5-c ラット血清による複合体の物理化学的性質の変化

一方でラット血清とのインキュベーションにより複合体の肺への集積量は減少した。しかし複合体と血清タンパクとの相互作用により凝集体ができ、肺の毛細血管に塞栓するという報告もあることから (65, 71)、ラット血清とのインキュベーション後の複合体の粒子径およびゼータ電位を測定した。その結果、両複合体とも粒子径の顕著な増大は認められなかった (Table 1)。またゼータ電位に関しては、血清とのインキュベーションにより約+40 mV から約-10 mV と負電荷に転じた。これは負電荷を持つ血清タンパクが複合体表面に結合することで、複合体表面が負に帯電するようになったものと推察された。

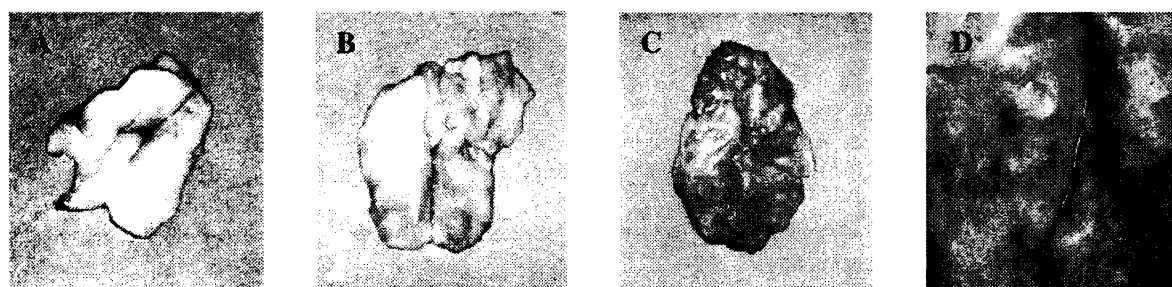
#### 5-d 複合体と相互作用したラット赤血球の肺への集積

両複合体とも赤血球懸濁液とブレインキューベートすることでその 80 %以上が赤血球に結合するにもかかわらず、非常に高い肺への集積を示すことが明らかとなった。しかし本章 2-b で示したように、両複合体間で赤血球との相互作用に違いが見られることから、両複合体間で複合体に結合した赤血球側の動態に違いがないか検討するため、灌流終了後の赤血球の肺への集積を観察した。

**Table 1 Physicochemical properties of pDNA-cationic liposome complexes before and after exposure to rat serum.**

Complex	Particle size (nm)		Zeta potential (mV)	
	Before	After	Before	After
DOTMA/Chol-complex	187.0 ± 22.7	207.4 ± 9.7	46.53 ± 1.9	-11.15 ± 0.7
DOTMA/DOPE-complex	189.8 ± 10.5	234.4 ± 20.1	34.50 ± 1.2	-12.71 ± 0.6

The complex dispersions were mixed with rat serum at the final serum concentration of 33.3 % and the mixtures were incubated for 5 min before measurement.



**Fig. 27 Erythrocyte accumulation after a 5 min perfusion.** Erythrocyte suspensions were incubated with DOTAM/Chol-complex or DOTMA/DOPE-complex for a 5 min before perfusion (final erythrocyte concentration 13.3 %). (A) erythrocyte suspension alone, (B) mixture of erythrocyte suspension and DOTMA/Chol-complex, (C) and (D) mixture of erythrocyte suspension and DOTMA/DOPE-complex. The whole lungs were excised after a 5min perfusion.

まず赤血球のみを灌流した場合、赤血球は全く肺に滞留していなかった (Fig. 27A)。また DOTMA/Chol 複合体とインキュベーションした場合においても赤血球の肺への顕著な集積は見られなかった (Fig. 27B)。しかし DOTMA/DOPE 複合体とインキュベーションした場合、著しい赤血球の集積が認められた (Fig. 27C)。また赤血球は肺の血管に沿って集積している様子が観察された (Fig. 27D)。

## II-6 考察

pDNA/カチオン性リボソーム複合体は高い安全性や低い抗原性などから静脈内投与による *in vivo* 遺伝子導入に適したベクターであると考えられるが、強い正電荷を持つために静脈内投与後標的以外の細胞や血清タンパクと非特異的に相互作用することが予想される。これらの相互作用は複合体を不安定化するだけでなく、複合体の体内動態を制御する上で大きな障害になると考えられ、それらに関する研究はより優れた遺伝子キャリアーの開発に向けて極めて重要であると思われる。そこで本章では DOTMA/Chol 複合体、DOTMA/DOPE 複合体、DOTMA 複合体の物理化学的性質や構造

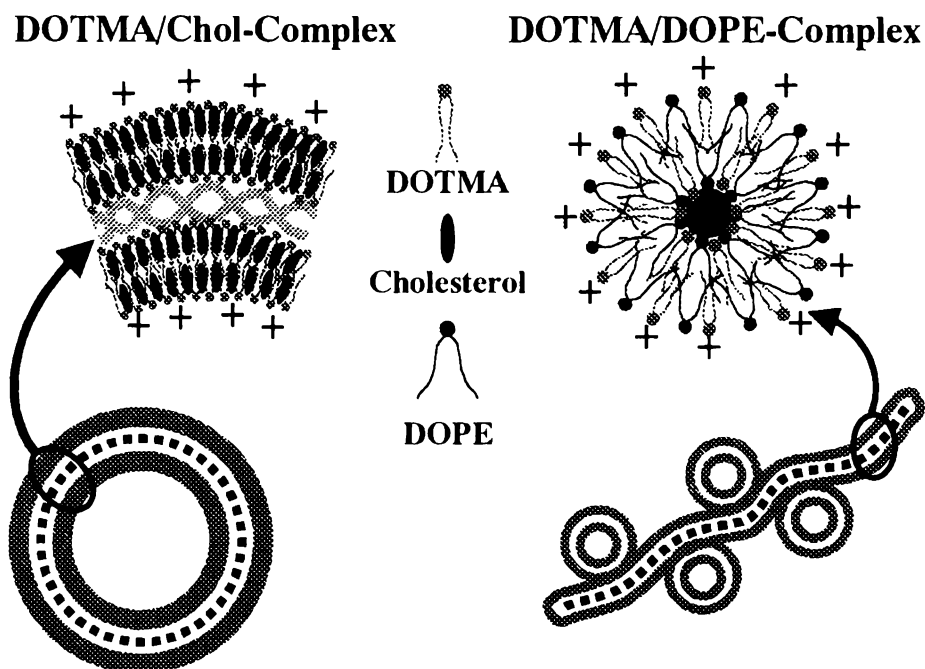


Fig. 28 Schematic structures of DOTMA/Chol- and DOTMA/DOPE-complex.

を明らかにするとともに、血液成分のうち血球成分との相互作用が静脈内投与後の遺伝子発現と体内動態に及ぼす影響について検討した。さらに静脈内投与による遺伝子導入においてどのような物性が重要であるか考察を加えた。

まず本章における検討では、電荷比+2.24 で調製した複合体を用いた。電荷比は第 I 章でも示したように、*in vivo*、*in vitro* を問わず、遺伝子発現効率を決める重要な要因である (16-18, 56)。静脈内投与による遺伝子導入においては高電荷比の複合体を用いることでより高い遺伝子発現が得られる (56) が、電荷比+2.53 以上では一部のカチオン性リボソームが複合体を形成せず単独で存在することが報告されている (72)。複合体を形成しない単独のカチオン性リボソームは遺伝子発現効率を上昇させることが報告されており (73)、今回は複合体自身の遺伝子発現効率を評価するため単独のリボソームが存在しない電荷比を採用した。

遺伝子導入実験に先立ち、複合体の物理化学的性質および構造を検討した。粒子径およびゼータ電位などの基本的な物理化学的性質に関しては各複合体間に大きな違いは認められなかったものの、その微細な構造には大きな違いが見られた。AFM および SAXS による解析の結果、DOTMA/Chol 複合体では脂質成分が安定なラメラ構造をとっており、DNA はリボソームの内部に脂質二重膜にはさまれるような形で存在することが示唆された (Fig. 28)。これに関しては Templeton らも DOTAP/Chol リボソームを用いた検討において同様の報告をしている (54)。Templeton らは DNA 鎖と脂質二重膜の厚さの和が 6.5 nm であったと報告しているが、これは今回の DOTMA/Chol 複合体の結果 (6.83 nm) とよく対応している。一方で DOTMA/DOPE 複合体に関しては、pDNA に由来するループ状の構造が観察されたことから、リボソーム同士が融合することで脂質の運動が起こり、脂質成分が DNA 鎖を脂質二重膜からなるチューブ構造の内部に包みこむような構造をとっている

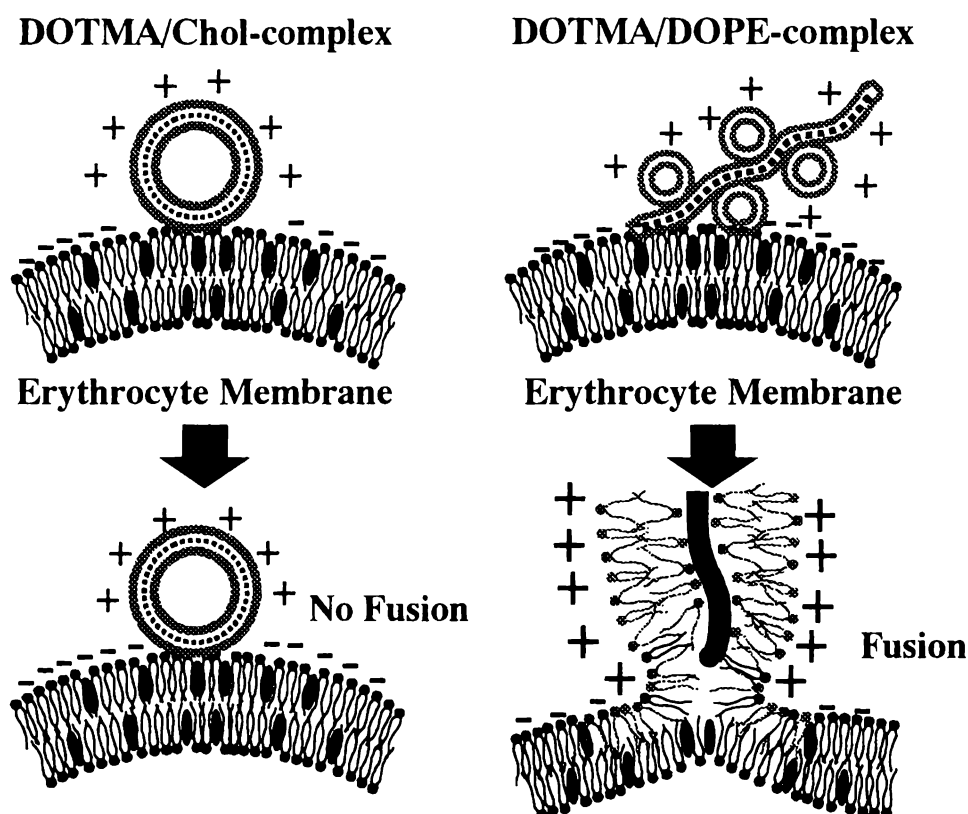
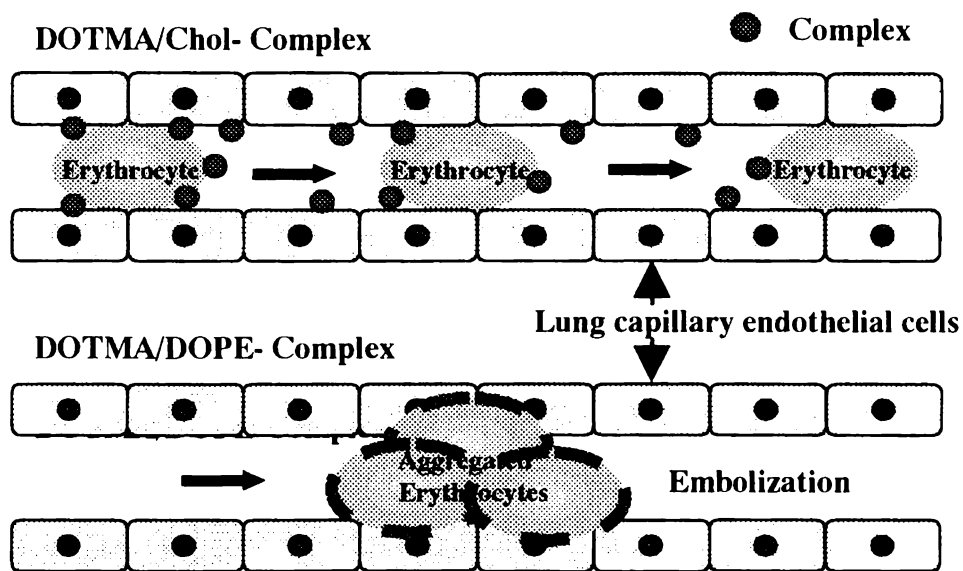


Fig. 29 Interaction between pDNA-cationic liposome complexes and erythrocytes.

ことが示唆された (Fig. 28)。DOPEはその特異な形状からこのような構造をとりやすいと考えられる。これは Sternberg らが提唱する Spaghetti-meatball structure に類似した構造であり、Sternberg らはこの構造がエンドソーム膜との融合に重要であると考察している (40)。またこれらの構造は赤血球同士の融合に関しても大きな役割を果たしていると考えられる。脂質が安定なラメラ構造を持つ複合体は生体成分との相互作用においても高い安定性を示すことが指摘されており、Boukhnikachvili らはラメラ構造を持つ複合体が血清存在下においても高い遺伝子発現を示すことを報告している (74)。また脂質成分がラメラ構造を持つ複合体は生体膜のモデルである負電荷リポソームと静電的に結合しても融合を起こさないことから (49)、脂質成分がラメラ構造を示した DOTMA/Chol 複合体は赤血球と結合しても融合しないものと思われる (Fig. 29)。一方 DOTMA/DOPE 複合体では、DOPE 分子自身も膜融合に重要なヘキサゴナル構造をとることから膜融合を促進すると考えられている (48, 75)。また複合体のループ状の部分では脂質成分が極めて曲率の高い構造をとっており、曲率は脂質膜の融合において重要な要因であることから (76)、今回の赤血球間の融合においてもこの曲率の高い構造が融合を促進していると思われる (Fig. 29)。今回 X 線小角散乱法による検討においては電荷比+2.24 の DOTMA/DOPE 複合体では明確なピークが得られなかったが、これは脂質同士の静電的反発や高い膜流動性によるものと思われる。膜の流動性も膜融合において重要な要因であり (76)、今回蛍光異方性の実験からも示されたように DOPE の添加により膜流動性が上昇したことから、DOTMA/DOPE 複合体における脂質成分の高い膜流動



**Fig. 30 Postulated mechanism of cationic liposome-mediated gene transfer to lung endothelial cells after intravenous administration.**

性も赤血球との融合において重要な要因であると思われる。

今回本章II-2の検討から各複合体が血清タンパクだけでなく、血球成分とも血清タンパクと同程度の割合で結合することが明らかとなった。また静脈内投与後の体内動態実験においても、複合体は約半分が血球成分に結合していたことから、血球への結合が静脈内投与後にも血管内で起きていることが示唆された。また DOTMA/DOPE 複合体は DOTMA/Chol 複合体に比べ若干高い結合量を示したが、これは赤血球との融合に起因するものと推察される。今回の結果は複体の静脈内投与による遺伝子導入では血清タンパクとの相互作用だけでなく、血球成分との相互作用も考慮しなければいけないことを示唆している。Aoki らも静脈内投与したカチオン性リボソームが赤血球と相互作用する可能性を指摘しており (77, 78)、赤血球との相互作用は pDNA-カチオン性リボソーム複合体に限らず、正電荷を持つ物質において考慮しなければいけない問題であるかもしれない。また血球への結合においては各複合体とも同程度の値を示したものの、DOTMA/DOPE 複合体は赤血球同士の融合および凝集を引き起こすなど、その相互作用の様式については大きな違いが認められた。この融合は血清タンパク存在下でも観察されることから静脈内投与後においても血管内において同様の現象が起きているものと思われる。また DOTMA/DOPE 複合体は静脈内投与前に赤血球懸濁液とインキュベーションすることで著しく遺伝子発現量を減少させることから、赤血球と融合することで脂質成分を失い遺伝子発現効率を減少させると考えられた。一方 DOTMA/Chol 複合体、DOTMA 複合体は赤血球に結合するものの、融合を引き起こさず形状を維持したまま赤血球に結合しているため遺伝子導入能力を保持していると思われる。

このような血球成分との相互作用の違いは複体の静脈内投与後の体内動態の違いにも影響を及ぼすものと思われる。本章II-4およびII-5の結果から推察すると、DOTMA/Chol 複合体は赤血球と融合せずに静電的に結合しているので、肺の毛細血管を通過する際に赤血球から肺の血管内皮

細胞に移行するものと思われる (Fig. 30)。赤血球の直径 (約  $7\text{ }\mu\text{m}$ ) が毛細血管の直径 (約  $5\text{ }\mu\text{m}$ ) と近いこと複合体が血管内皮細胞に移行しやすく、また血管内皮細胞に吸着した複合体はエンドサイトーシスにより内在化をうけるため (79)、本章 II-4 においても肺に長時間滞留したものと思われる。一方 DOTMA/DOPE 複合体は赤血球同士の融合および凝集を引き起こし、その大きさのため肺の毛細血管に塞栓してしまうものと思われる (Fig. 30)。Yoshioka らも粒子径  $15\text{ }\mu\text{m}$  以上の微粒子は肺毛細血管に塞栓してしまうことを報告している (80)。そのため投与直後は肺に集積するものの内在化されず、徐々に血流によって洗い流されるため肺から消失していき、肝臓に取り込まれるものと推察された。

今回血清タンパクとの相互作用による遺伝子発現効率の有意な減少は認められなかった。従来のリボソーム製剤に関しては静脈内投与後、血清タンパクのうち補体成分との相互作用により膜の不安定化および貪食細胞への取り込み促進が報告されているが (81-86)、複合体に関しては補体を失活させたマウスにおいても複合体の遺伝子発現効率および体内動態に違いが認められなかったことが報告されている (87)。これは補体との特異的相互作用に比べ、アルブミンなど血清タンパクとの静電的な非特異的相互作用がより起こりやすいものと思われる (64)。よって今回の検討においても同様の現象が起こっているものと思われるが、血清タンパクとの相互作用は複合体の遺伝子発現効率に対して赤血球との相互作用ほど影響力は大きくないことが示された。また血清タンパクとの相互作用は複合体の肺への集積を増加させることなく、むしろ減少させることが明らかとなった。血清とのインキュベーションによって肺への集積が減少したのは、複合体の表面電位の低下による血管内皮細胞との親和性の減少によると思われる。同様の現象は肝灌流系におけるリボソームの肝取り込みにおいても観察されている (88)。Huang らは血清タンパクとの相互作用による複合体の粒子径の増大が肺への集積に関与することを考察しているが、今回顕著な粒子径の増大は認められず、肺への集積に関してもむしろ減少させることが示された。

以上の一連の検討結果より、赤血球に代表される血球成分との相互作用は静脈内投与後の複合体の遺伝子発現および体内動態を左右する大きな要因であり、その相互作用においては複合体の構造特性が非常に重要であることが示された。Chol を中性脂質として用いることで脂質成分がラメラ構造を保ち赤血球に安定に結合するため、遺伝子導入能力を失うことなく、肺に効率よく再分布し高い遺伝子発現を示すことが明らかとなった。また静脈内投与による遺伝子導入用キャリアーの開発においては、血清タンパクとの相互作用のみならず血球成分との相互作用も検討する必要があることが示された。これまで複合体と血清タンパクとの相互作用についてはいくつか報告があったものの、血球成分との相互作用に関しては全く報告がなく、大変興味深い知見と思われる。さらに今後特定臓器へのターゲティング能を付与したキャリアーを設計するためには、複合体の肺への集積を回避する必要がある、そのためには表面電荷を下げることで標的細胞以外の細胞や血球成分への吸着を抑えることが必要不可欠であると思われる。

### 第Ⅲ章 転移性肺癌モデルマウスへのインターフェロン（IFN）遺伝子導入による抗腫瘍効果

前章においてレポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用いて静脈内投与による *in vivo* 遺伝子導入を行い、DOTMA/Chol リポソームとの複合体が肺に効率よく集積するとともに、高い遺伝子発現を示すことを明らかにした。よって本法は肺における疾患に対する有効な治療方法となりうると考えられる。

遺伝子治療の対象となる疾患のうち、癌は最も重要なターゲットのひとつであり、多くの臨床試験が行われている（89-106）。癌に対する遺伝子治療においては自殺遺伝子（89-93）や癌抑制遺伝子（94-97）、抗腫瘍免疫を誘導するサイトカイン遺伝子（98-106）の導入など、様々な方策がとられている。しかしこれらの臨床試験のほとんどは癌への局所投与もしくは *ex vivo* 法に限られている。*ex vivo* 法は繁殖性やコストの面から限界があり、また局所投与は転移性の癌への適用は難しいことから、全身投与による遺伝子デリバリー技術の確立が期待されている。

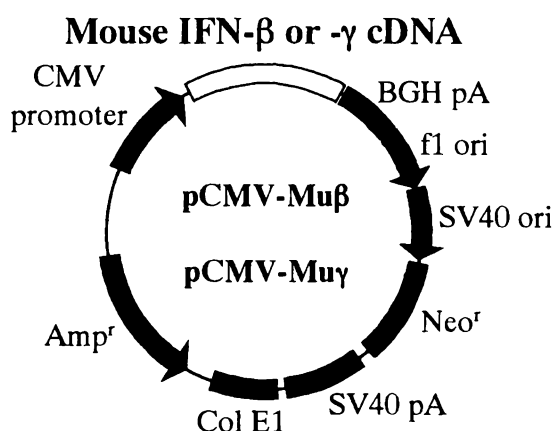
既に示したように複合体の静脈内投与法は肺特異的に複合体を送達できかつ極めて高い遺伝子発現効率を示すこと、また肺組織のなかでも肺の血管内皮細胞に遺伝子発現が局在することから、転移性肺癌治療へ適用できる簡便な方法と考えられる。また転移性肺癌は癌細胞が肺の血管内皮細胞に接着することから始まり、癌細胞が血管内で増殖していくことで形成されと考えられており（107）、また腫瘍増殖において必要不可欠である新生血管の内皮細胞は通常の内皮細胞に比べより高い複合体取り込みを示す（108）ことから、複合体の静脈内投与法は転移性肺癌に対する有効な治療方法となりうると思われる。

導入する遺伝子のなかでも自己の強い抗腫瘍免疫を誘導できるサイトカイン遺伝子導入による癌治療は副作用も少なく、有効な治療方法として期待されている（98-107）。インターロイキン（IL）（5, 99, 101）や顆粒状マクロファージ刺激因子（GM-CSF）（98, 100）など様々なサイトカインが遺伝子治療に用いられているが、なかでもインターフェロン（IFN）は最も期待されているサイトカインの一つである（102-106）。IFN は type I（IFN- $\alpha/\beta$ ）と type II（IFN- $\gamma$ ）とに大別されるが、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）の発現増強（109）、細胞増殖抑制（110, 111）、Natural killer cell（NK cell）やマクロファージなどの活性化（112, 113）、血管新生阻害（114-116）など、種々の生物活性を持っており、IFN 製剤は既に臨床においては抗がん剤や抗ウイルス剤として使用されている。

一方、複合体の静脈内投与による *in vivo* 遺伝子導入においては非特異的に TNF- $\alpha$ 、IL-12、IFN- $\gamma$  などのサイトカインが誘導され、これらサイトカインが様々なメカニズムを介して抗腫瘍効果を示すことが報告されている（117, 118）。またこれらサイトカインは血管内皮細胞に障害を与えることで肺における遺伝子発現効率に大きな影響を及ぼす可能性が示唆されているが（119, 120）、これらのサイトカインは細菌由来の DNA に多く存在する CpG-motif と呼ばれる塩基配列をもつ DNA 鎖がマクロファージや樹状細胞、B 細胞などの免疫担当細胞に取り込まれることで細胞を活性化し、放出されることが明らかになっている（121-129）。しかしながら静脈内投与時に体内のどの免疫担当

細胞がこれらのサイトカイン放出に関与しているか、現在のところ解明されていない。これらを明らかにすることは複合体による抗腫瘍効果のメカニズム解明だけでなく、複合体の静脈内投与による遺伝子治療の実現に向けて重要な知見になるものと思われる。

そこで本章においては、転移性肺癌モデルマウスに対し抗腫瘍効果が期待できるインターフェロン（IFN）遺伝子を静脈内投与により肺に導入し、複合体の静脈内投与による *in vivo* 遺伝子治療への応用の可能性について検討した。さらに複合体の静脈内投与後の非特異的サイトカイン誘導に関与する細胞について検討を加えた。



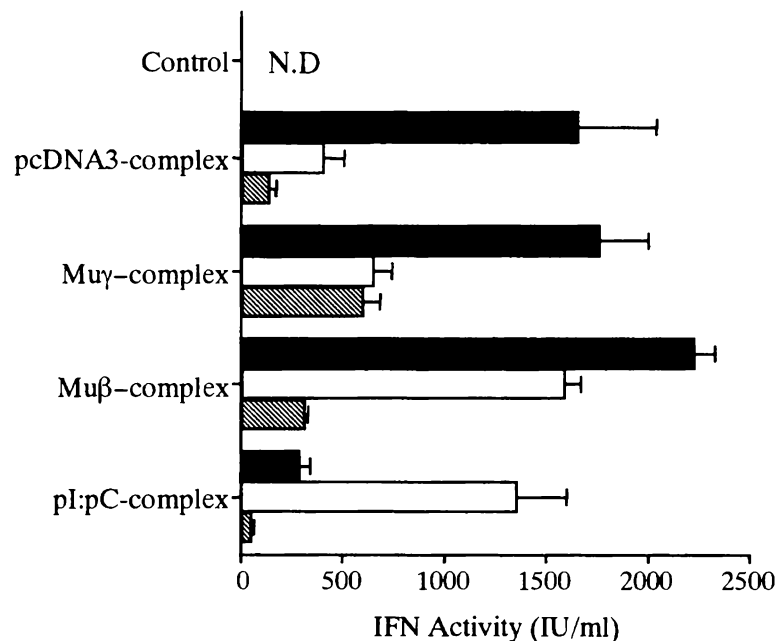
**Fig. 31 Structure of mouse IFN- $\beta$  and IFN- $\gamma$  expression vectors pCMV-Mu $\beta$  and pCMV-Mu $\gamma$  for *in vivo* gene therapy.**

### III-1 複合体の静脈内投与による肺でのインターフェロン発現

前章においてルシフェラーゼをレポーター遺伝子として用いた場合、肺で高い遺伝子発現効率が得られたが、同様の現象が分泌タンパクとして発現される IFN についても観察されるかどうか検討した。実験方法としては複合体投与より 2 時間後、マウスを開胸して肺を摘出し細断した。それらを培地存在下 4 時間組織培養し、培養上清中の IFN 活性を bioassay により測定した (130)。また IFN のサブタイプは各型 IFN に特異的な単クローン抗体を用いて決定した。インターフェロン（IFN）遺伝子としては、マウス IFN- $\beta$  発現プラスミドベクター pCMV-Mu $\beta$ 、マウス IFN- $\gamma$  発現プラスミドベクター pCMV-Mu $\gamma$  を用いた。さらに強力な type I IFN の inducer である合成二本鎖 RNA poly I:poly C (pI:pC) を用いた。またコントロールとして、cDNA の挿入されていない発現ベクター pcDNA3 を用いた。これらを DOTMA/Chol リボソームを用いて複合体（電荷比+2.24）を形成させ、25  $\mu$ g DNA/mouse (pI:pC では 12.5  $\mu$ g/mouse) の投与量でマウスに尾静脈内投与した。

その結果、pI:pC 複合体を除く全ての複合体において高活性の IFN- $\alpha$  が認められた (Fig. 32)。また Mu $\beta$  複合体、pI:pC 複合体投与群においては他の投与群に比べ有意に高い IFN- $\beta$  活性が見られた。一方 Mu $\gamma$  複合体投与群においては他の投与群に比べ高い IFN- $\gamma$  活性が観察されたが、その差は小さ





**Fig. 32 Secretion of IFNs from lung after intravenous administration of the complexes.** IFN- $\alpha$  (closed bar), IFN- $\beta$  (open bar), IFN- $\gamma$  (hatched bar). Twenty-five  $\mu$ g DNA (12.5  $\mu$ g pI:pC) complexed with DOTMA/Chol liposome were injected into mice. IFNs' yields in the culture medium were determined by bioassay. Each result represents the mean  $\pm$  S.D. of three lungs.

いものであった。この理由としては IFN- $\gamma$  の比活性が IFN- $\alpha$  や IFN- $\beta$  に比べ低いことが考えられる。

以上の結果より、ルシフェラーゼ遺伝子導入と同様に分泌タンパクである IFN においても肺で高い発現が得られることが示された。

### III-2 転移性肺癌モデルマウスへの複合体を用いた IFN 遺伝子導入による抗腫瘍効果

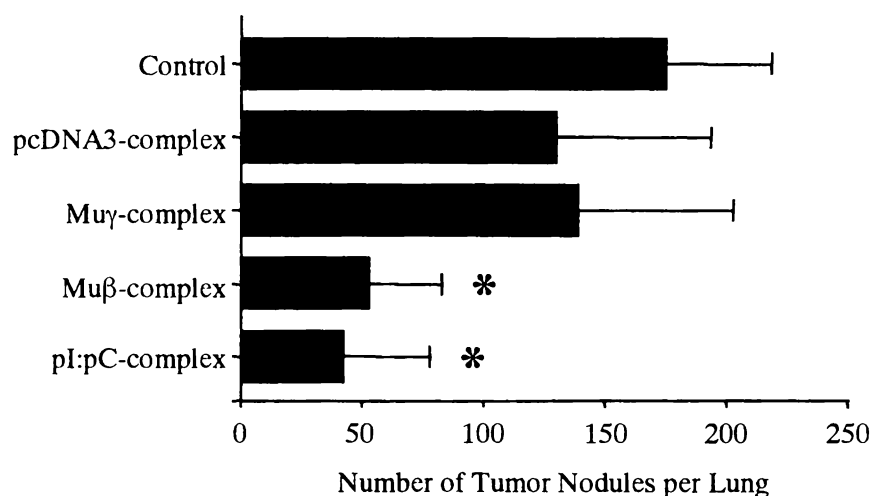
#### 2-a 転移性肺癌モデルマウスの作成

マウス大腸癌細胞株 CT-26 細胞をマウス CDF<sub>1</sub> (5 週齢、雄性) に  $1 \times 10^5$  個尾静脈内投与することにより肺に転移結節を作成した。静脈内投与による癌細胞移植より 7 日後、各複合体を静脈内投与した。さらに投与より 10 日後、マウスを開胸し、肺をメタノールで固定後転移結節数を計測した。

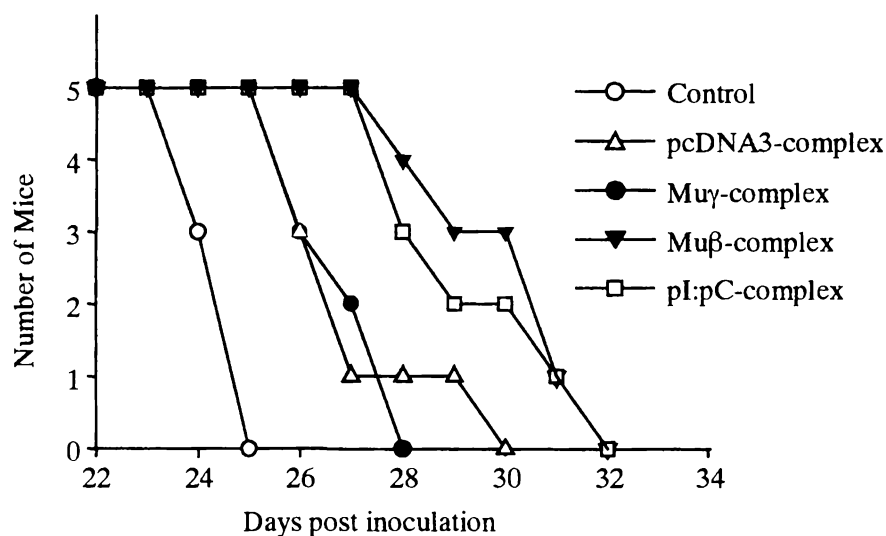
#### 2-b 複合体の静脈内投与による IFN 遺伝子導入の抗腫瘍効果

Fig. 33 に、移植より 17 日後の肺における転移結節数を示した。Mu $\beta$ 複合体、pI:pC 複合体投与群では、pcDNA3 複合体および Mu $\gamma$ 複合体投与群に比べ顕著な腫瘍増殖阻害を示した。また延命効果を評価する実験においても、両投与群は他の投与群に比べ優れた生存日数延長効果を示した。

(Fig.34)。pcDNA3 複合体および Mu $\gamma$ 複合体投与群は、5 %dextrose 溶液投与群に比べ長い生存日数  
を示したものの、転移結節数に関しては有意な治療効果が認められなかった。



**Fig. 33 Reduction in lung tumor burden by intravenous administration of the complexes.** Tumors were established in mice by intravenous injection of  $1 \times 10^5$  cells per mouse. Seven days after inoculation, mice were injected intravenously with the complexes. The mice were sacrificed 17 days after inoculation. Each result represents the mean  $\pm$  S.D. of nine to ten mice. There are statistically significant differences by ANOVA: \*,  $P < 0.01$ , versus pcDNA3-complex.

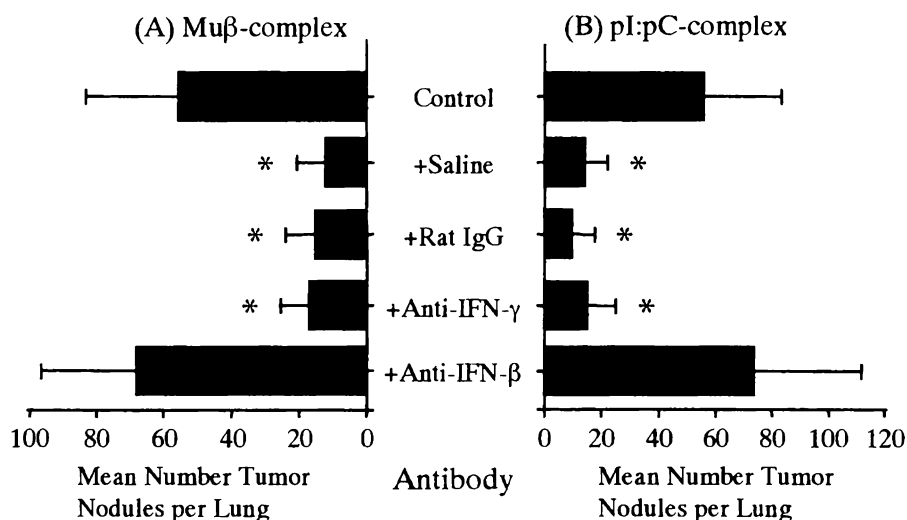


**Fig. 34 Effect of the complex injections on survival times in mice with lung metastases.** Tumors were established in mice by intravenous injection of  $1 \times 10^5$  cells per mouse. Seven days after inoculation, mice (five per treatment group) were injected intravenously with the complexes.

## 2-c 抗 IFN 抗体前処理による抗腫瘍効果阻害

Mu $\beta$ 複合体、pI:pC 複合体投与による腫瘍増殖阻害が遺伝子導入によって発現した IFN- $\beta$ によるも

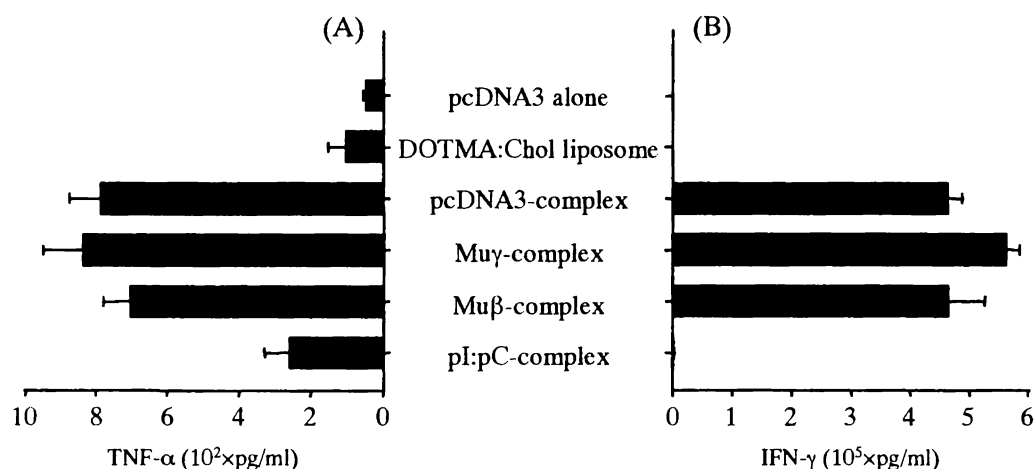
のかどうかを検討するため、複合体投与12時間前に各種抗体 200  $\mu$ g を腹腔内投与した。その結果、Mu $\beta$ 複合体、pI:pC 複合体投与群ともに saline 前投与群、rat IgG 前投与群および Anti-IFN- $\gamma$ 抗体前投与群では腫瘍増殖抑制への影響が見られなかったのに対し、Anti-IFN- $\beta$ 抗体前投与群では腫瘍増殖抑制が完全に阻害された (Fig. 35)。よって両複合体投与による腫瘍増殖抑制効果は複合体投与によって肺で発現した IFN- $\beta$ によるものであることが示された。



**Fig. 35 Antitumor activity of Mu $\beta$ - and pI:pC-complexes: effect of antibodies.** (A) Mu $\beta$ -complex, (B) pI:pC-complex. Two hundred  $\mu$ g antibodies were intraperitoneally injected 12 h before complex injection. The complexes were intravenously injected 7 days after inoculation. Each result represents the mean  $\pm$  S.D. of five mice. There are statistically significant differences by ANOVA: \*,  $P < 0.01$

### III-3 複合体の静脈内投与による非特異的サイトカインの誘導

近年、細菌由来の DNA に多く存在する CpG-motif と呼ばれる塩基配列をもつ DNA 鎖がマクロファージや樹状細胞、B 細胞などの免疫担当細胞に取り込まれることで細胞を活性化し、様々な炎症性サイトカインが放出されること (121-129)、さらに複合体の静脈内投与によっても血液中に種々のサイトカインが放出され、抗腫瘍効果を示すこと (117-120) が報告されている。そこで今回用いた複合体を静脈内投与することで非特異的に誘導されるサイトカイン量に違いが見られるどうか、検討した。その結果、pcDNA3 複合体、Mu $\beta$ 複合体および Mu $\gamma$ 複合体投与群において大量の TNF- $\alpha$  および IFN- $\gamma$  の誘導が観察された (Fig. 36)。IFN- $\gamma$  の産生量においては Mu $\gamma$ 複合体投与群が若干高い値を示したものの、TNF- $\alpha$  産生量に関しては大きな違いが見られなかった。また pI:pC 複合体投与群に関しては、これらサイトカインの誘導はあまり観察されなかった。



**Fig. 36 Serum cytokine levels following intravenous injection of various types of the complexes.** (A) TNF- $\alpha$ , (B) IFN- $\gamma$ . Three hour (TNF- $\alpha$ ) and 6 hour (IFN- $\gamma$ ) after injection, serum was collected and assessed for levels of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  by ELISA.

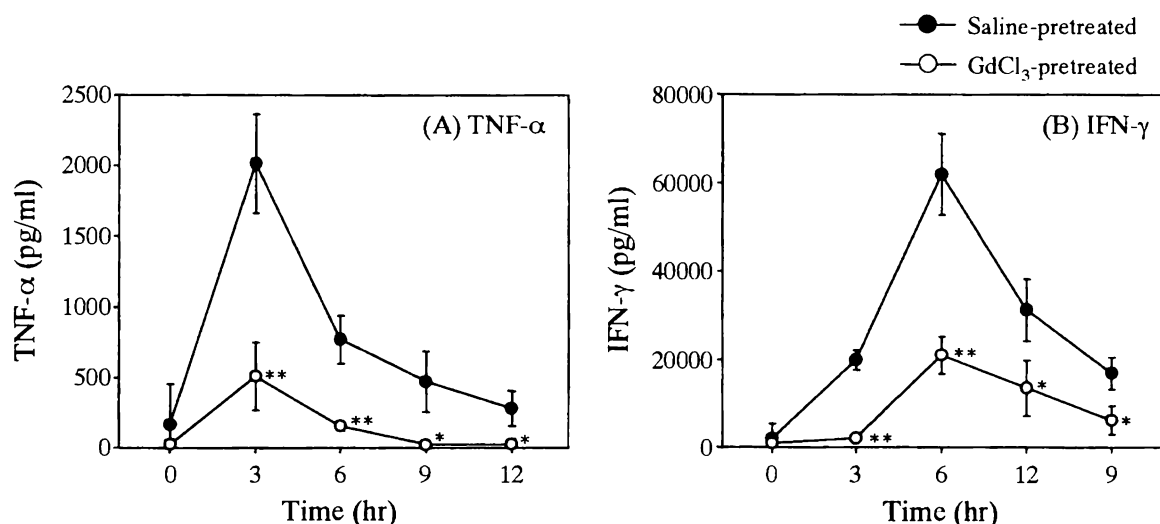
### III-4 複合体の静脈内投与による非特異的サイトカイン誘導における肝クッパー細胞の関与

前節で示したように pcDNA3 複合体投与群において多量の TNF- $\alpha$  および IFN- $\gamma$  産生が観察された。今回これら非特異的に誘導されるサイトカインの抗腫瘍効果への寄与は小さいと思われるが、pcDNA3 複合体投与群において生存日数の延長が見られるなど何らかの関与は否定できないと思われる。そこでこれらの非特異的に誘導されるサイトカインについて、どの細胞がこれらのサイトカインを産生しているか検討した。既に前章 II-4 で示したように、複合体は静脈内投与直後一時的に肺に集積するものの徐々に消失し、肝臓に取り込まれていく。その一方で肝臓と肺以外の臓器にはほとんど分布しない。また複合体は肝臓を構成する細胞のなかでも血管内皮細胞やクッパー細胞などの非実質細胞に取り込まれることが報告されている (131)。一方で複合体を取り込むことで TNF- $\alpha$  などのサイトカインを放出することが知られている細胞としては、マクロファージ、NK cell、T リンパ球、B リンパ球、単球などの免疫担当細胞が知られており (121-129)、複合体の動態特性と合わせて考えると肝クッパー細胞のサイトカイン放出への関与が予想される。そこで肝クッパー細胞を特異的に除去する Gadolinium Chloride (GdCl<sub>3</sub>) を静脈内投与することで肝クッパー細胞を除去し、サイトカイン誘導に及ぼす影響について検討した。

#### 4-a 複合体の静脈内投与による血中への TNF- $\alpha$ および IFN- $\gamma$ 分泌

実験方法としては複合体投与 24 時間前に GdCl<sub>3</sub> を 45 mg/kg の投与量で尾静脈内投与した。複合体投与後、経時的に血液を採取し血清中の TNF- $\alpha$  および IFN- $\gamma$  量を ELISA により測定した。その結

果、TNF- $\alpha$ では投与後 3 時間後、IFN- $\gamma$ では 6 時間後に最大血中濃度を示したが、両者とも GdCl<sub>3</sub> 前処理群において有意な減少が認められた (Fig. 37)。また両サイトカインとも徐々に血中より消失し、投与後 24 時間後にはほとんど検出されなかった。



**Fig. 37 Serum cytokine levels (A) TNF- $\alpha$ , (B) IFN- $\gamma$ , following tail vein injection of pcDNA3-complex.** Twenty-four hour before injection of pcDNA3-complex containing 25  $\mu$ g pcDNA3, saline (closed circle) or GdCl<sub>3</sub> (open circle) were injected into mice. At the indicated times after the complex injection, serum was collected and assessed for levels of cytokines. Bars represent the mean  $\pm$  S.D. of three mice. There are statistically significant differences Student's t-test: \*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ .

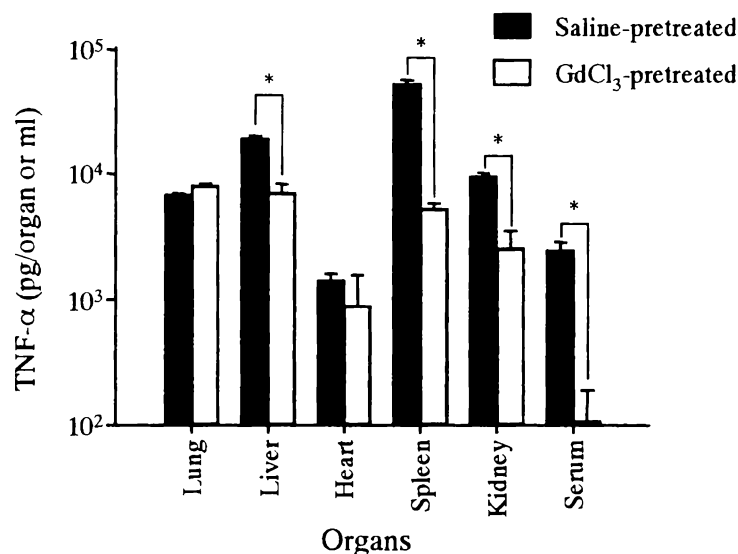
#### 4-b 複合体の静脈内投与後の各臓器における TNF- $\alpha$ 量

IFN- $\gamma$ は複合体を取り込み活性化したマクロファージなどから放出された TNF- $\alpha$ や IL-12 によってさらに活性化した NK cell から放出されることが知られている (118、132)。そこで以後、サイトカインを TNF- $\alpha$ に絞り実験を行った。複合体の静脈内投与後の各臓器に含まれる TNF- $\alpha$ 量を測定したところ、saline 前処理群では肝臓および脾臓、腎臓で高い値が見られた (Fig. 38)。またこれらの値は GdCl<sub>3</sub> 前処理群において有意に減少し、これらの臓器が TNF- $\alpha$ の産生部位である可能性が示唆された。他の臓器に関しても 5 %デキストロース溶液投与群に比べ優位に高い値を示したが、GdCl<sub>3</sub> 前処理による有意な影響は見られなかった。

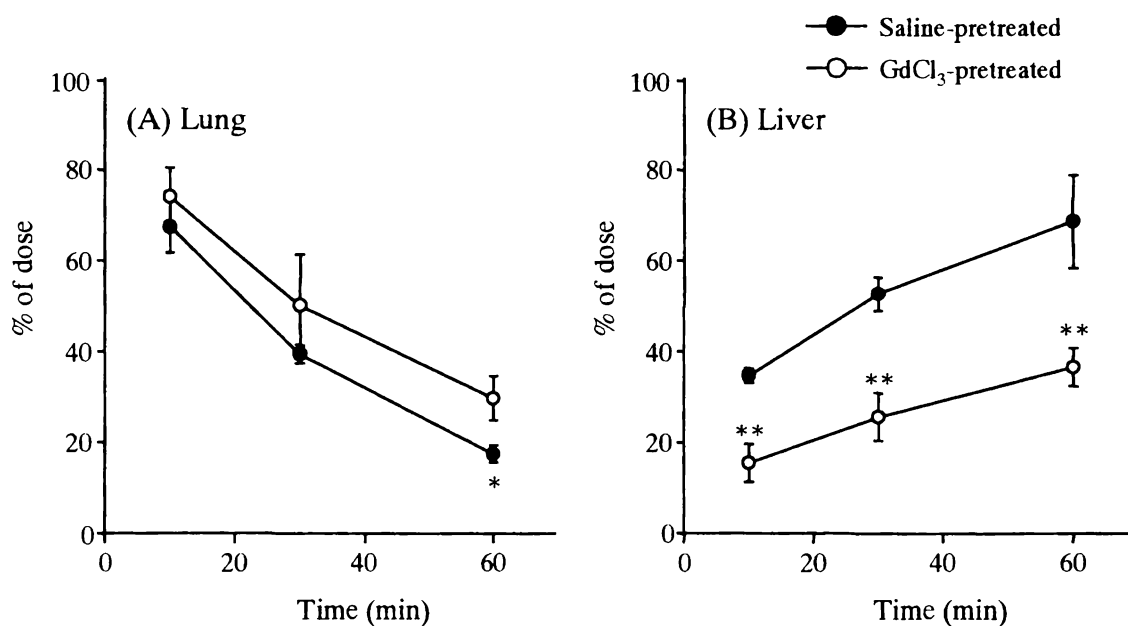
#### 4-c 静脈内投与後の複合体の体内動態に及ぼす Gadolinium Chloride 前処理の影響

GdCl<sub>3</sub> 前処理群による TNF- $\alpha$ 産生量の減少と複合体の体内動態との関連を検討するため、前章 II-4 と同様の方法で複合体の体内動態について検討した。その結果、saline 前処理群、GdCl<sub>3</sub> 前処理群ともに複合体は急速に血中から消失し、複合体の血中濃度に関しては両投与群に大きな差は見ら

れなかった。しかし肝臓への集積量は、 $\text{GdCl}_3$  前処理群で saline 前処理群に比べ約半分に減少した。一方、肺や脾臓をはじめとする他の臓器での集積量は逆に増加した (Fig. 39)。これは肝臓における取り込みが減少した分、他の臓器での取り込みが上昇したためと思われる。



**Fig. 38 TNF- $\alpha$  production in selected organs following tail vein injection of pcDNA3-complex.** Mice were injected with the complex containing 25  $\mu\text{g}$  pcDNA3. Three hour after injection, organs were excised and homogenized. The cytosolic fractions were assessed for TNF- $\alpha$  by ELISA. Bars represent the mean  $\pm$  S.D. of three mice. There are statistically significant differences by Student's t-test: \*,  $P < 0.01$ .



**Fig. 39 In vivo distribution of pcDNA3-complex after intravenous injection.** (A) Lung, (B) Liver. Twenty-four hour before injection, saline or  $\text{GdCl}_3$  were injected into mice. Groups of three mice received i.v. injections of the complexes at a dose of 25  $\mu\text{g}$  DNA per mouse. The results are expressed as a percentage of the injected dose per organ. There are statistically significant differences by Student's t-test: \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ .

### III-5 考察

pDNA-カチオン性リボソーム複合体は抗原性も低く、繰り返し投与も可能であることから静脈内投与による遺伝子導入に適しており、また肺特異的に高い発現を示すことから転移性肺癌治療に対する有効なベクターになりうると思われる。そこで本章においては転移性肺癌モデルマウスを作成し、抗腫瘍活性を持つサイトカインのうち IFN を選択し、IFN 遺伝子からなる複合体を静脈内投与してその腫瘍増殖抑制効果を検討した。その結果 IFN- $\beta$  遺伝子もしくは IFN- $\beta$  の inducer である pI:pC を含む複合体投与群において肺における顕著な IFN- $\beta$  産生および腫瘍増殖抑制効果が見られた。また複合体投与によって非特異的に産生される TNF- $\alpha$  は肝クッパー細胞によって産生されることが示唆された。

IFN は非常に多種多様の免疫調節作用および賦活作用を有し微量でその活性を発揮することが知られており、現在その IFN 製剤は既に抗がん剤として商品化されている。IFN のうち IFN- $\beta$  は IFN- $\alpha$  や IFN- $\gamma$  に比べ強い細胞増殖抑制効果を持つこと (110, 111)、マクロファージや NK cell の活性化 (112, 113)、MHC class I の発現増強 (133)、血管新生促進物質の産生抑制 (114-116) などの生物学的活性を持っていることからこれらのメカニズムを介して抗腫瘍効果を示すと考えられている。現在 IFN- $\beta$  遺伝子を脳腫瘍局所へ導入する臨床試験が行われているとともに、Natsume らは IFN- $\beta$  遺伝子を内封したカチオン性リボソームを脳腫瘍に局所投与することで cytotoxic T cell の流入を誘導し腫瘍が退縮することを報告している (134)。また Xu らはレトロウイルスベクターを用いて IFN- $\beta$  安定発現株を作成しこれらの細胞の腹腔内腫瘍形成が阻害されるとともにマクロファージの抗腫瘍活性が増加することを明らかにしている (135)。今回の検討においてはこれらのうちのどの作用が抗腫瘍効果に対し大きな役割を果たしているかは明らかでないが、各メカニズムがそれぞれ抗腫瘍活性に寄与しているものと思われる。

今回は合成二本鎖 RNA である pI:pC を含む複合体においても有意な腫瘍増殖抑制効果が見られた。pI:pC はウイルス複製時に合成される二本鎖 RNA のモデルとして用いられ、強力な type I IFN の inducer であることが知られている (136-138)。既に Okamoto らは、カチオン性リボソームと複合体を形成させ各種培養細胞に pI:pC を導入することで、高活性の IFN- $\beta$  を誘導できることを見いだしている (139)。そこで本手法を静脈内投与に応用した。その結果、pI:pC からなる複合体を静脈内投与することにより、肺で IFN- $\beta$  産生を誘導できるとともに腫瘍増殖抑制効果が得られることを示した。また抗 IFN- $\beta$  抗体前処理群で抗腫瘍効果に阻害が見られたことから複合体投与により誘導された IFN- $\beta$  が抗腫瘍効果に大きな役割を果たしていることが示唆された。Hirabayashi らは pI:pC が癌細胞の細胞質内に放出されることによって細胞死を誘導すること、それによって腫瘍増殖抑制を示すことを報告している (140)。しかし今回の検討においては抗 IFN- $\beta$  抗体によって抗腫瘍効果に阻害が見られたこと、また遺伝子発現が主に血管内皮細胞で見られることから本検討における pI:pC による抗腫瘍効果は誘導された IFN- $\beta$  によるものであると思われる。

また IFN- $\beta$  による抗腫瘍効果に関しては腫瘍細胞が存在する肺組織での IFN- $\beta$  産生が重要である

と思われる。IFN- $\beta$ 安定発現細胞株を皮下に移植した際増殖抑制を示したものの、別の部位に移植した親株細胞には抗腫瘍効果を示さなかった報告があること (141) から IFN- $\beta$ による抗腫瘍効果は全身性のものではなく局所的であることが考えられる。

今回 pcDNA3 複合体、Mu $\beta$ 複合体および Mu $\gamma$ 複合体の静脈内投与後、非特異的に肺において IFN- $\alpha$ が、TNF- $\alpha$ および IFN- $\gamma$ が血中に誘導されることが示された。IFN- $\alpha$ の非特異的誘導に関してはあまり報告がなく今後の解明が待たれる。TNF- $\alpha$ および IFN- $\gamma$ の誘導に関してはいくつかのグループから報告されており (117-120)、これには塩基配列中に存在する CpG-motif が大きく関与していると報告されている (121-129)。これら CpG-motif はマクロファージや樹状細胞に取り込まれることでそれらの細胞を活性化し TNF- $\alpha$ や IL-12 の放出を誘導するとともに、さらに NK cell を活性化し IFN- $\gamma$ の放出を誘導する (132)。またこれらのサイトカインは様々な機構を介し抗腫瘍活性を誘導することから、タンパクを何もコードしていないコントロール pDNA からなる複合体を静脈内投与することで転移性肺癌および皮下腫瘍の増殖抑制が見られることが報告されている (117, 118)。しかし今回は pcDNA3 複合体では治療効果が見られず、また Mu $\beta$ 複合体の抗腫瘍効果も抗 IFN- $\gamma$ 抗体によって阻害されなかったことから非特異的に誘導されるこれらサイトカインよりも DNA にコードされた IFN- $\beta$ が肺転移結節増殖抑制効果においてより重要であることが示された。この理由としては複合体投与時点での腫瘍形成の程度の違いが考えられる。本実験においては移植より 7 日後に複合体を投与しているが、移植より 4 日後に複合体を投与した場合には全ての複合体において有意な増殖抑制効果が見られた。同様の結果は Dow らによっても報告されている (142)。また細胞の免疫原性による違いも指摘されている。今回用いた CT-26 細胞は免疫原性が低いことが知られており、Whitmore らは免疫原性の低い細胞は IFN- $\gamma$ など Th1 型サイトカインに対して感受性が低い可能性を指摘している (117)。

しかしながら pcDNA3 複合体投与群と 5 %デキストロース投与群との間には転移結節数に有意な差は認められなかったものの延命効果を調べた実験においては生存日数の延長が認められることから、これら非特異的に産生されるサイトカインの抗腫瘍効果へのある程度の寄与は完全には否定できないものと思われる。複合体の静脈内投与により TNF- $\alpha$ および IL-12 が誘導され、これらがさらに NK cell を活性化するとともに肺および脾臓への集積を誘導するため、そこで高い IFN- $\gamma$ 産生量が見られることが報告されている (118)。TNF- $\alpha$ は NK cell を活性化させるだけでなく血管内皮細胞への接着を増加させるため (143)、NK cell がそれらの臓器に接着したものと思われる。また NK cell は IFN- $\beta$ によっても活性化されることから、今回非特異的に誘導されたサイトカインにより肺に接着した NK cell が IFN- $\beta$ によってさらに活性化された可能性が考えられる。現在 NK cell がどのような機構で癌細胞を認識し抗腫瘍活性を示すかに関しては不明な点も多いが、今回の抗腫瘍効果においても NK cell が大きな役割を果たしていることが考えられ、複合体の静脈内投与による NK cell の誘導および活性化メカニズムの更なる解明が待たれる。

これら非特異的サイトカインの誘導に関して、今回肝クッパー細胞を特異的に除去する GdCl<sub>3</sub>の前処理により複合体の肝取り込みおよび TNF- $\alpha$ の産生量が減少したことから、これらのサイトカイン



ンのうち TNF- $\alpha$ は肝クッパー細胞から産生されていることが示唆された。GdCl<sub>3</sub>は血中でコロイド粒子を形成することで肝クッパー細胞にエンドサイトーシスされ、再び酸性画分で溶解することで細胞死を引き起こすと考えられている (144)。肝クッパー細胞は組織常在性マクロファージの一種であり、血流に侵入したウイルスの捕食だけでなく微粒子性キャリアの取り込みにおいても大きな役割を担っている。前章II-4で示したように複合体は静脈内投与直後、肺に集積するがその後肝臓に取り込まれる。Mahatoらは肝臓を構成する細胞のうち、非実質細胞に選択的に取り込まれることを報告しており (131)、また *in vitro* において血管内皮細胞は複合体を取り込んでも TNF- $\alpha$ を放出しないことを我々は確認していることから肝クッパー細胞が主な産生細胞だと思われる。今回各臓器における TNF- $\alpha$ 量の検討では脾臓および腎臓においても GdCl<sub>3</sub> 前処理により有意な TNF- $\alpha$ 量の減少が認められたが、これらの臓器には肝臓と比べてあまり複合体は集積せず、むしろ集積量は GdCl<sub>3</sub> 前処理により逆に増加したことからこれらの臓器の TNF- $\alpha$ 産生への関与は低く、血中に放出された TNF- $\alpha$ がこれらの臓器に集積したために高い値が見られたものと思われる。またこれらのサイトカインは血管内皮細胞に障害を与えることで遺伝子発現効率を低下させることが報告されており (119, 120)、肝クッパー細胞への取り込みを抑えることによる炎症性サイトカインの産生量抑制は遺伝子発現効率の改善につながるとと思われる。

以上の一連の検討結果より、複合体の静脈内投与による肺への IFN- $\beta$ 遺伝子導入が転移性肺癌に対する有効な治療方法となりうる可能性が示唆された。また複合体の静脈内投与により非特異的に誘導される TNF- $\alpha$ は肝クッパー細胞から産生されることが示された。これらの知見は複合体の静脈内投与による遺伝子治療の実現に向けて有益な情報を与えるものと思われる。

## 結論

以上、著者は三章にわたり、プラスミド DNA/カチオン性リボソーム複合体の物理化学的性質と遺伝子発現効率の関連を *in vitro* および *in vivo* において系統的に検討し、さらに複合体を用いた *in vivo* 遺伝子治療への応用について検討を加え、以下の結論を得た。

### 第 I 章 プラスミド DNA/カチオン性リボソーム複合体の物理化学的性質と *in vitro* における細胞内動態および遺伝子発現効率の関連

培養細胞での遺伝子発現効率と複合体の物理化学的性質との関連について検討することを目的に、カチオン性リボソームとホタルルシフェラーゼをコードした pDNA を種々の割合で混合し調製した複合体の物理化学的性質および複合体の細胞内動態、遺伝子発現効率を評価した。複合体の粒子径およびゼータ電位はリボソーム量の増加とともに変化し、ある混合比においては粒子径が増大するとともにゼータ電位が負から正に変化した。またこれ以上の混合比において原子間力顕微鏡 (AFM) を用いた検討では脂質成分が DNA を完全に覆う様子が観察された。各種培養細胞における検討では、遺伝子発現量は pDNA とリボソームの混合比によって大きく変化した。最も高い複合体の細胞内取り込み量を示す混合比と最大の遺伝子発現量を示す混合比とは完全には一致しなかった。そこで複合体の細胞内動態について検討したところ、取り込みは大きいものの発現量の低かった混合比では、細胞内で pDNA が複合体から分離せずエンドソーム内にとどまる傾向が見られ、一方で発現効率の高かった混合比の複合体では pDNA が複合体から分離しやすいことが示された。以上の結果より、各混合比で調製した複合体は取り込み量と細胞内動態の違いにより異なる遺伝子発現量を示すことが明らかとなった。

### 第 II 章 プラスミド DNA/カチオン性リボソーム複合体の物理化学的性質と静脈内投与時の遺伝子発現効率の関連

次に複合体の物理化学的性質と *in vivo* における遺伝子発現との関連について明らかにすることを目的に、Cholesterol (Chol) もしくは DOPE を含むリボソームからなる複合体を調製し、その構造および物理化学的性質について AFM および X 線小角散乱を用いて評価するとともに、マウスに静脈内投与後の遺伝子発現効率について検討した。その結果 Chol を含む複合体では脂質成分が安定なラメラ構造を持つため、静脈内投与後赤血球に結合しても安定な構造を保ち、特に肺において高い遺伝子発現効率を示した。一方、DOPE を含む複合体では曲率の高い不安定な構造を持つため、赤血球同士の融合や凝集を誘導し遺伝子発現効率を減少させることが示唆された。またラット肺灌流法を用いた検討の結果、Chol を含む複合体では赤血球に結合した複合体が毛細血管を通過する際

に赤血球から分離し血管内皮細胞に結合するのに対し、DOPEを含む複合体では赤血球同士の融合および凝集を引き起こすことで物理的に毛細血管に塞栓してしまうことが明らかとなり、物性の違いによる赤血球との相互作用の違いが肺への集積様式に大きな影響を与えることが示唆された。

### 第III章 転移性肺癌モデルマウスへのインターフェロン（IFN）遺伝子導入による抗腫瘍効果

前章において、静脈内投与後カチオン性リボソームとの複合体が肺で高い遺伝子発現量を示したことより、肺における疾患を対象とした遺伝子治療に有用なベクターとなることが示唆された。そこでマウス大腸癌細胞を用いて転移性肺癌モデルマウスを作成し、各種 IFN 遺伝子導入による抗腫瘍効果を検討した。その結果 IFN- $\beta$  遺伝子および IFN- $\beta$  のインデューサーである poly I:poly C の投与で有意な抗腫瘍効果および肺における IFN- $\beta$  産生が認められた。また抗体による阻害実験の結果から遺伝子導入により産生される IFN- $\beta$  が抗腫瘍効果に重要であることが示された。以上の結果より、抗原性が低く安全性の高い pDNA/カチオン性リボソーム複合体の静脈内投与法が、転移性肺癌の治療に対する有用なアプローチとなりうる可能性が示唆された。また複合体の静脈内投与により非特異的に誘導される TNF- $\alpha$  は主に肝クッパー細胞より産生されることが明らかとなった。

以上、著者は pDNA/カチオン性リボソーム複合体の物理化学的性質と *in vitro* および *in vivo* 遺伝子発現効率との関連について検討し、複合体の物理化学的性質および構造を明らかにするとともに生体内での各プロセスおよび最終的な遺伝子発現効率との関連に関する知見を得た。また複合体の静脈内投与による遺伝子治療の可能性を示した。

以上の結果は、pDNA/カチオン性リボソーム複合体を用いた *in vivo* 遺伝子治療の実現に向けて複合体設計の有用な基礎的知見となるものと考えられる。

## 謝辞

終わりに臨み、本研究に際して、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました京都大学橋田 充教授に衷心より深甚なる謝意を表します。

また、終始御懇切なる御助言と御指導を賜りました京都大学高倉喜信教授に謹んで深く感謝の意を表します。

さらに、実験に際し多くの有益な御助言と御指導を戴いた京都大学山下富義助教授、京都大学松本 治助教授、京都大学渡部好彦助教授、国立医薬品食品衛生研究所大阪支所斎藤博幸氏、通産省工業技術院馬場照彦氏に心から感謝の意を表します。

また、種々の貴重な御助言を賜りました京都大学西川元也助手並びに京都大学大学院薬学研究科薬品動態制御学、病態情報薬学分野教室員一同に深謝します。

最後に、実験の一部に御協力戴いた井上瑠衣修士、西岡 毅学士、寺田 武学士に深く感謝いたします。

## 実験の部

### 第 I 章 実験の部

#### 【1】 試薬

DOTMA は東京化成社より、DOPE および MTT 試薬は Sigma 社より購入した。また $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  はアマシャム社より購入した。

#### 【2】 プラスミド DNA およびカチオン性リボソーム

##### (1) プラスミド DNA

Firefly luciferase 発現ベクター pCMV-Luc は、pGL3-control ベクターから切り出した cDNA フラグメントを、pcDNA3 ベクター (Invitrogen 社) のマルチクローニングサイト (*Hind III*/*Xba I* サイト) に挿入することにより作成した。プラスミド DNA は、大腸菌 *DH5  $\alpha$*  に transform した後、2×YT 培地中で増殖させ、pDNA 精製キット QIAGEN Plasmid Giga Kit と EndoFree Plasmid Buffer Set (ともに QIAGEN 社) により抽出・精製を行った。複合体の *in vitro* 細胞取り込み実験に際しては、プラスミド DNA をニックトランスレーション法により  $^{32}\text{P}$  放射標識したものを用いた (145)。共焦点レーザー顕微鏡による複合体の細胞内動態の検討においては、FastTag FL labeling kit (Vector Laboratories 社) により fluorescein を導入した蛍光標識体を用いた。

##### (2) カチオン性リボソーム

カチオン性リボソームはクロロホルムに溶解したカチオン性脂質 DOTMA と中性脂質 DOPE をモル比 1:1 になるよう混合し、減圧下ナス型フラスコ底部に脂質薄膜を作った。完全にクロロホルムを取り除いた後、精製水を加えて Hydrate しリボソーム懸濁液を得た。Extruder<sup>®</sup> (Lipex Biomembrane 社) を用いて、2 枚重ねの polycarbonate 膜 (Nucleopore 社) に加圧下通すことにより、平均粒子径約 100 nm の均一なリボソーム粒子を得た。さらに濾過滅菌後リン定量 (146) により濃度を 1 mg/ml に調製した。共焦点レーザー顕微鏡による複合体の細胞内動態の観察においては、rhodamine 標識 DOPE を全脂質量に対して 2 mol% カチオン性リボソームに組み込んだ蛍光標識リボソームを用いた。

#### 【3】 複合体の調製

まずカチオン性リボソーム懸濁液を無血清培地 Opti-MEM I (粒子径およびゼータ電位測定では

150 mM NaCl 水溶液) で全脂質量 0.1 mg/ml になるよう希釈し 30 分室温にて放置した。その後同様に 0.01 mg/ml に希釈したプラスミド DNA 溶液と各電荷比になるよう混合し 15 分放置した後に使用した。

#### 【4】 複合体の物理化学的性質の評価

##### (1) 複合体の粒子径およびゼータ電位の測定

複合体の粒子径の測定には、光散乱光度計 (Super Dynamic Light Scattering Photometer, LS-900, 大塚電子) を用いて動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering) により測定した。また表面電荷の指標であるゼータ電位の測定は、電気泳動光散乱計 (Laser electrophoresis zeta potential analyzer, LEZA-700, 大塚電子) を用いて電気泳動光散乱法にて測定した。

##### (2) 原子間力顕微鏡による複合体の構造観察

原子間力顕微鏡 (Nanoscope AFM system, Digital Instruments 社) による複合体の構造の観察においては、精製水中で調製した複合体をさらに精製水で希釈し雲母上に添加した。雲母に吸着させるため 90 秒放置し、精製水で軽く雲母上を洗浄した。その後窒素ガスを吹き付けることで表面を乾燥させた。観察は気相中にてタッピングモードで観察した。

#### 【5】 細胞株

培養細胞としてはマウス膀胱癌細胞 MBT-2、ヒト臍帯血管内皮細胞 HUVEC、マウス繊維芽細胞 NIH3T3、マウスマクロファージ RAW264 を用いた。MBT-2 および RAW264 は 10 % 牛胎児血清含有 RPMI1640 培地、NIH3T3 は 10 % 牛胎児血清含有 DMEM 培地、HUVEC は 10 % 牛胎児血清含有 Medium199 培地中で培養した。

#### 【6】 遺伝子導入実験

##### (1) 細胞への遺伝子導入

まず各種培養細胞を 1 ウェルあたり  $2 \times 10^5$  個ずつ 6 ウェルプレートに播種した。その 24 時間後、細胞を無血清培地で 1 回洗浄した後、1  $\mu$ g の DNA からなる複合体を含む無血清培地 2 ml を細胞に添加した。6 時間培養後、培地を 10 % 血清を含む通常培地に交換し、さらに 42 時間培養した。合計 48 時間培養後、細胞中のルシフェラーゼ活性を測定した。

##### (2) ルシフェラーゼ活性の定量

48 時間培養後の細胞を PBS(-) で 2 回洗浄後、セルスクレイパーを用いて細胞を回収した。細胞懸

濁液を 37 °C の湯浴および液体窒素に交互に浸すことにより計 3 回凍結・融解を繰り返した。遠心操作 (14000 rpm、10 分間) の後、上清 10  $\mu$ l をルシフェラーゼ発光基質溶液 (ピッカ・ジーン、東洋インキ) 100  $\mu$ l と混合し、直ちにルミノメーター (Lumat LB 9507, EG&G Berthold Japan 社) にて 10 秒間の累積発光量 (Relative light units: RLU) を測定した。さらに Bradford 法によりタンパク量を測定して、細胞単位タンパク量当たりの遺伝子発現量 (RLU/mg-protein) を算出した。

## 【7】 複合体の細胞内取り込み実験

### (1) 細胞内取り込み実験

各種培養細胞を 12 穴プレートに 1 ウェル当たり  $0.8 \times 10^5$  個ずつ 12 ウェルプレートに播種した。細胞を無血清培地で洗浄した後、実験する温度 (37 °C あるいは 4 °C) で 30 分間インキュベートした。その後培地を取り除き  $^{32}\text{P}$  標識プラスミド DNA を含む複合体を細胞に添加し、6 時間インキュベートした。6 時間後、氷冷した Hanks' balanced salt solution (HBSS) で細胞を洗浄し、0.1 % Triton X-100 含有 0.3 M NaOH 水溶液で可溶化した。その溶液を回収し放射活性を測定し、さらに Lowry 法 (146) によりタンパク量を測定して細胞単位タンパク量当たりの取り込み量を求めた。

### (2) 放射活性の定量

$^{32}\text{P}$  放射活性の測定は、各サンプルを HCl で中和後、液体シンチレーションカウンター用メディウム (Clear-sol I, ナカライテスク社) を 5 ml 加えて液体シンチレーションカウンター (LSC-5000C, Beckman 社) で測定した。

## 【8】 複合体による細胞毒性の評価

96 穴プレートに各種培養細胞を 1 ウェル当たり  $1 \times 10^4$  個ずつ播種し、【6】遺伝子導入実験と同様に複合体を添加した。複合体を添加して 6 時間後、細胞数を MTT 法により測定した。複合体添加より 6 時間後、複合体を含む培地を取り除き 0.5 mg/ml MTT 溶液 100  $\mu$ l を加えた。4 時間インキュベーションののち、10 % SDS 溶液 100  $\mu$ l を加え 37 °C にて一晩放置した。そしてマイクロプレートリーダー (Model 450 microplate reader, Bio-Rad 社) にて吸光度 570 nm、reference 660 nm で測定した (147)。

## 【9】 負電荷リボソームによる複合体からのプラスミド DNA の放出の評価

Szoka らの方法に従い (33)、エチジウムブロマイドを各電荷比の複合体懸濁液に 0.4  $\mu$ g/ml になるよう加え、励起波長 500 nm、蛍光波長 610 nm で蛍光光度計を用いて測定した。エンドソーム膜のモデルである負電荷リボソーム (PS:PE:PC=1:2:1, molar ratio) をエチジウムブロマイドを含

む複合体懸濁液に加え蛍光強度変化を観察し、プラスミド DNA の複合体からの放出の指標とした。

#### 【10】共焦点レーザー顕微鏡を用いた複合体の細胞内動態の評価

HUVEC 細胞をガラスプレート上に【6】遺伝子導入実験と同様に播種し、蛍光標識プラスミド DNA/rhodamine 標識カチオン性リボソーム複合体（電荷比+1.12 および+2.24）を添加した。細胞を 4 時間インキュベートした後、氷冷した PBS(-)で洗浄し 4%パラホルムアルデヒド 0.01 %グルタルアルデヒド溶液で 20 分間インキュベートし細胞を固定した。PBS(-)で再び洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡（MRC-1024, Bio-Rad 社）で観察した。



## 第II章 実験の部

### 【1】 試薬

コレステロール (Chol) はナカライテスク社より購入した。1,6-diphenylhexatriene (DPH) は Molecular Probes 社より購入した。それ以外の試薬に関しては第I章【1】と同じ物を用いた。

### 【2】 プラスミド DNA およびカチオン性リボソーム

#### (1) プラスミド DNA

第I章【2】(1)と同様の方法で作成した firefly luciferase 発現ベクターpCMV-Luc もしくは $\beta$ -galactosidase 発現ベクターpCMV-LacZ を用いた。これらプラスミド DNA は第I章【2】(1)と同様の方法で精製した。また放射標識プラスミド DNA に関しても第I章【2】(1)と同様の方法で調製した。

#### (2) カチオン性リボソーム

カチオン性脂質 DOTMA と中性脂質 DOPE もしくは Chol をモル比 1:1 で混合し、第I章【2】(2)と同様の方法で調製した。ただし Hydration には 5 %デキストロース溶液を用いた。DOTMA/Chol リボソームの濃度測定に関しては Free cholesterol E-test Wako (和光純薬社)を用いた。DOTMA リボソームに関しては Extruder<sup>®</sup>を通さずに実験に用いた。

### 【3】 複合体の調製

粒子径およびゼータ電位の測定においては、まずカチオン性リボソーム懸濁液を 5 %デキストロース溶液で 0.1 mg DOTMA/ml になるよう希釈し、同様に 0.01 mg/ml に希釈したプラスミド DNA 溶液と各電荷比になるよう混合し 30 分放置した後に使用した。*in vivo* 遺伝子導入実験においては 1 mg DOTMA/ml カチオン性リボソーム懸濁液をプラスミド DNA 溶液 (0.33 mg/ml) と電荷比+2.24 で混合し調製した。室温で 30 分間放置した後に実験に用いた。

### 【4】 複合体の物理化学的性質の評価

#### (1) 複合体の粒子径およびゼータ電位の測定

第I章【4】(1)と同様の方法で測定した。

#### (2) 蛍光異方性の測定

各混合比で調製したカチオン性リボソームに 1,6-diphenylhexatriene (DPH) を全脂質量に対して 0.5 mol%になるよう組み込んだ。蛍光異方性は 37 °Cにて励起波長 360 nm、蛍光波長 434 nm で測定し、方程式に従い計算した (149)。

### (3) 原子間力顕微鏡による複合体の構造観察

第 I 章【4】(2)と同様の方法で観察した。

### (4) X線小角散乱による複合体の構造の評価

2 mg/ml のプラスミド DNA 溶液と 20 mg DOTMA/ml リボソーム懸濁液を電荷比+1.12 および+2.24 で混合して複合体を調製し、ガラス製キャピラリーに移した。X線小角散乱の測定には Rigaku RU-200 X-ray generator を用い、X線には銅を線源とする波長 0.15418 nm のものを使用した。データの記録および解析に関しては Rigaku imaging plate reader ならびに Rigaku RINT2000 system を用いた。感光時間は 105 分まで、測定温度は 23°C以下にて実験した。ラメラ構造の周期性は Bragg の方程式を用いて計算した (150)。

### 【5】 マウス血清および赤血球懸濁液の調製

マウス血清は五週齢 ICR 雌性マウスの下大静脈より採血し、37 °Cにて 3 時間、4 °Cにて一晩放置した後、遠心分離 (5000 rpm, 5 分間) することにより回収した (151)。赤血球懸濁液に関してはヘパリン処理したシリンジで同様に採血した後、遠心分離 (5000 rpm, 5 分間) し上清および白血球画分を除いた。さらに 150 mM NaCl 10 mM Hepes buffer を加えて再分散し赤血球を洗浄した。上記の操作を 3 回繰り返した後、指定の濃度になるよう 150 mM NaCl 10 mM Hepes buffer に分散させた (152)。

### 【6】 複合体の血球成分への結合

<sup>32</sup>P 標識プラスミド DNA を含む複合体をマウス全血液と体積比 1:5 で混合し、3 分間放置した。遠心分離 (5000 rpm, 5 分間) の後、上清を回収し第 I 章【7】(2)と同様の方法で放射活性を測定した。マウスヘマトクリット値を 47 %とし (153)、全放射活性から全上清に含まれる放射活性を差し引くことで血球成分に結合している複合体量を求めた。

静脈内投与後の複合体の血球成分への結合に関しては、<sup>32</sup>P 標識プラスミド DNA を含む複合体を静脈内投与後、経時的にマウスを屠殺し、血液を採取した。一部を全血の放射活性測定用に採取した後、遠心して plasma 画分を得た (5000 rpm, 5 分間)。その後全血および plasma 画分中の放射活性を測定し、上記と同様の方法で血球成分に結合している複合体量を求めた。

## 【7】 赤血球との相互作用

本章【5】の方法で調製した0.1%マウス赤血球懸濁液 600  $\mu$ l と複合体 50  $\mu$ l を混合し、37  $^{\circ}$ C顕微鏡下観察した。

## 【8】 複合体の静脈内投与による *in vivo* 遺伝子発現実験

第II章【3】の方法で調製した複合体を五週齢 ICR 雌性マウスに尾静脈より 25  $\mu$ g DNA/mouse の投与量で投与した。投与より 24 時間後、マウスを麻酔下開腹し下大静脈を切断、同時に門脈より生理食塩水を注入し、各臓器に含まれる血液を完全に除いた。各臓器（肺、肝臓、心臓、腎臓、脾臓）を切り出し、重量測定後、Lysis buffer（0.05 %Triton-X, 0.1 M Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH7.4）を臓器重量の4倍量加え（肝臓に関しては5倍量）、ホモジネートした。その後第I章【6】（2）と同様の方法で各臓器中に含まれるルシフェラーゼ活性を測定した。さらに Lowry 法によりタンパク量を測定して、組織単位タンパク量当たりの遺伝子発現量（RLU/mg-protein）を求めた。マウス血清および赤血球との相互作用に関して複合体とそれぞれを体積比 2:1（v:v）で混合し、37  $^{\circ}$ Cにてインキュベートした後に静脈内投与した。

## 【9】 肺における遺伝子発現細胞の同定

$\beta$ -galactosidase 発現ベクターpCMV-LacZ および DOTMA/Chol リボソームを用いて複合体を調製し、50  $\mu$ g DNA/mouse の投与量で静脈内投与した。投与より6時間後、麻酔下マウスを開胸し、肺を生理食塩水で灌流した。さらに Tissue-Tek OCT : PBS（2:1, v:v）混合液を気道側および血管側から流し込み、液体窒素を用いて凍結させた。その後クリオスタットを用いて厚さ7~10  $\mu$ m の新鮮凍結切片を作成し、切片を8%パラホルムアルデヒド-PBSで固定、X-gal 染色液（1 mg/ml X-gal, 2 mM  $MgCl_2$ , 5 mM  $K_3Fe(CN)_6$ , 5 mM  $K_4Fe(CN)_6$  in PBS(-)）で37  $^{\circ}$ Cにて overnight 処理した。その後切片をPBS(-)で洗浄し、核および細胞質を Nuclear fast red 試薬（Wako 社）で染色した。さらにPBS(-)で洗浄しエタノールおよびキシレンで固定後、標本用封入剤（New M.X., 松浪硝子工業）で封入し、検鏡した。

## 【10】 複合体の静脈内投与後の *in vivo* 体内動態の評価

第I章【2】（1）と同様の方法で標識した  $^{32}P$  標識プラスミド DNA を用いて複合体を調製した。25  $\mu$ g DNA/mouse の投与量でマウス尾静脈より静脈内投与し、経時的に屠殺して血液中および臓器中の放射活性を測定した。各サンプルは血液 10  $\mu$ l、各臓器 100 mg 程度を重量測定後、Soluene-350（Packard 社）により可溶化し、2N-HCl で中和、 $H_2O_2$  で脱色後、液体シンチレーション用メデュウ

ム (Clear-sol I, ナカライテスク社) を 5 ml 加えて液体シンチレーションカウンター (LSC-5000C, Beckman 社) で測定した。

## 【1 1】ラット肺灌流法

### (1) 灌流実験手技

Wistar 系雄性 rat (約 200 g) を pentobarbital (60 mg/kg, i.p.投与) 麻酔下へパリン (1000 unit/kg) を静脈内投与し、5 分後開腹および開胸した。下大動脈を切断するとともに、肺動脈および左心室にカニューレを挿入し肺灌流を開始した。灌流液には 95 % O<sub>2</sub>-5 % CO<sub>2</sub> で平衡化した Krebs-Ringer bicarbonate buffer (pH 7.4, 10 mM グルコースおよび 6 %デキストラン分子量 70000 含有) を 0.45 μm のフィルターを通した後用いた。灌流液をペリスタポンプで肺動脈より 8 ml/min の流速で注入し左心室より灌流液を流出させる single-pass 法で灌流を行った。5 分間の予備灌流後、<sup>32</sup>P 標識プラスミド DNA を含む複合体を 25 μg DNA/animal の投与量で六方バルブインジェクターを用いて肺動脈より矩形注入した。投与 5 分後に灌流を終了し、肺を取り出して肺中放射活性を測定した。サンプルの調製および測定に関しては第 II 章【1 0】と同様の方法で測定した。ラット全血液、ラット血清、ラット赤血球との相互作用については灌流前に複合体をそれぞれと 5 分間 37 °C にてインキュベーションした後に灌流系に矩形注入した。

### (2) 肺灌流における赤血球の集積

複合体をラット赤血球と最終的な赤血球濃度が 13.3 % になるよう混合し 37 °C にて 5 分間インキュベートした。赤血球と複体の混合液を灌流系に注入し 5 分間灌流した後に、肺を取り出し赤血球の集積を観察した。

## 【1 2】粒子径およびゼータ電位に及ぼすラット血清の影響

複合体をラット血清と最終的な血清濃度 33.3 % になるよう混合し、5 分間 37 °C にてインキュベートした。その後生理食塩水にてサンプルを希釈した後、第 I 章【4】(1) と同様の方法で粒子径およびゼータ電位を測定した。

## 【1 3】灌流液中での赤血球への結合

<sup>32</sup>P 標識プラスミド DNA を含む複合体をラット赤血球と最終赤血球濃度 3.3, 6.7, 13.3, 20 % となるよう混合し、5 分間室温でインキュベートした。遠心操作 (4000 rpm, 4 分間) の後、上清を回収し液体シンチレーション用メデュウム (Clear-sol I, ナカライテスク社) を 5 ml 加えて液体シンチレーションカウンター (LSC-5000C, Beckman 社) で測定した。サンプル中に含まれる全放射活性が

ら上清中の放射活性を引くことで赤血球に結合した複合体の量を求めた。

### 第III章 実験の部

#### 【1】 プラスミド DNA およびカチオン性リボソーム

##### (1) IFN- $\beta$ および IFN- $\gamma$ 発現プラスミド DNA

IFN- $\beta$ 発現プラスミド pCMV-Mu $\beta$ は Kawabata らの作成したものを用いた (154)。IFN- $\gamma$ 発現プラスミド pCMV-Mu $\gamma$ は Nomura らの作成したものを用いた (155)。各種プラスミド DNA の精製は、第I章【2】(1)と同様の方法で行った。

##### (2) カチオン性リボソームの作成

クロロホルムに溶解したカチオン性脂質 DOTMA と中性脂質 Chol をモル比 1:1 で混合し第II章【2】(2)と同様の方法で調製した。

#### 【2】 複合体の調製

1 mg DOTMA/ml カチオン性リボソーム懸濁液をプラスミド DNA 溶液 (0.33 mg/ml) と電荷比 +2.24 で混合し調製した。室温で 30 分間放置した後に実験に用いた。合成二本鎖 RNA poly I:poly C (pI:pC) を含む複合体においてもプラスミド DNA と同様に、pI:pC 溶液 (0.33 mg/ml) をカチオン性リボソーム懸濁液と電荷比+2.24 で混合し調製した。

#### 【3】 肺における IFN 産生量の測定

##### (1) 肺の摘出および組織培養

各種複合体をマウスに静脈内投与 (25  $\mu$ g DNA/mouse) した 2 時間後麻酔下開胸し、肺を灌流して脱血した。肺全体を摘出後メスを用いて細断し、24 穴プレートで 10 %牛胎児血清含有 RPMI1640 培地 1 ml とともに培養した。4 時間後、上清を回収しろ過滅菌した後、IFN 活性を測定した。

##### (2) IFN 活性の測定

培養上清中の IFN 活性は、渡部らの方法に従い、以下のような bioassay により行った (130)。1 日目に 96 穴プレートにマウス繊維芽細胞 L 細胞を  $3 \times 10^5$  cells ずつ播く。2 日目に IFN を含有する培養上清を L 細胞に添加する。3 日目にその L 細胞に水疱性口内炎ウイルス (VSV) を感染させる。4 日目にウイルスによる細胞変性効果を観察し、生細胞をクリスタルバイオレットで染色する。次に、対照 IFN による効果と比較することにより国際単位 (IU) を算出する。IFN のサブタイプは各型 IFN に特異的な単クローン中和抗体を用いて上述のアッセイ法により決定したが、その際用いた抗体はそれぞれ抗 IFN- $\alpha$ 抗体 (4E-A1) (156)、抗 IFN- $\beta$ 抗体 (7E-D3) (156)、抗 IFN- $\gamma$ 抗体 (R4-6A2)

(157) である。

#### 【4】 転移性肺癌モデルマウスの作成

10 %牛胎児血清含有 RPMI1640 培地中で培養したマウス大腸癌細胞株 CT-26 細胞をトリプシン処理した後 PBS(-)に分散させた。マウス CDF<sub>1</sub> (5 週齢、雄性) に  $1 \times 10^5$  個の CT-26 細胞を尾静脈内投与することにより肺に転移結節を作成した。

#### 【5】 各種 IFN 遺伝子を含む複合体の静脈内投与による治療実験

##### (1) 治療実験

移植より 7 日後、各種複合体を 25  $\mu$ g DNA/mouse (pI:pC に関しては 12.5  $\mu$ g pI:pC/mouse) の投与量で尾静脈内投与した。移植より 17 日後 (複合体投与より 10 日後)、マウスを麻酔下開胸しメタノールで固定、肺における転移結節を計測した。また複合体の静脈内投与による延命効果の検討においても同様に作成したマウスに複合体を投与し、各投与群の生存日数を測定した。

##### (2) 抗体投与による阻害実験

(1) と同様のスケジュールにおいて、複合体投与 12 時間前にラット IgG、抗マウス IFN- $\beta$ 抗体および抗マウス IFN- $\gamma$ 抗体 200  $\mu$ g/mouse の投与量で腹腔内投与した。複合体投与から 10 日後に肺における転移結節を測定した。

#### 【6】 血中に誘導される非特異的サイトカインの定量

各種複合体を静脈内投与した後 (25  $\mu$ g DNA/mouse)、眼瞼下より経時的に採血した。3 時間 4°C にて凝血させた後、血清画分を遠心分離した。採取した血清は希釈した後、ELISA キット (TNF- $\alpha$  および IFN- $\gamma$ 、Genzyme 社) を用いて添付プロトコールに従って定量した。

#### 【7】 複合体投与による非特異的サイトカイン誘導における肝クッパー細胞の関与

##### (1) 複合体の静脈内投与による血中への TNF- $\alpha$ および IFN- $\gamma$ の放出

複合体投与の 24 時間前に Gadolinium Chloride (GdCl<sub>3</sub>) を 45 mg/kg の投与量で尾静脈内投与した。pcDNA3 を用いて本章【3】と同様に複合体を調製し、25  $\mu$ g DNA/mouse の投与量で尾静脈内投与した。以下本章【6】と同様の方法で評価した。

##### (2) 複合体の静脈内投与後の各臓器における TNF- $\alpha$ 量

本章【8】(1)と同様に  $\text{GdCl}_3$  前処理したマウスに pcDNA3 からなる複合体を 25  $\mu\text{g}$  DNA/mouse の投与量で尾静脈内投与した。投与から 3 時間後、マウスを屠殺し各臓器を取り出した。各臓器に各種 protease inhibitor (Aprotinin 2.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Leupeptin 2.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Pepstatin A 1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , PMSF 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を含む PBS(-) 2 ml でホモジネートし、遠心操作 (14000 rpm、10 分間) の後、上清を ELISA キットを用いて定量した。

### (3) 複合体の静脈内投与後の体内動態に及ぼす $\text{GdCl}_3$ 処理の影響

本章【8】(1)と同様に  $\text{GdCl}_3$  前処理したマウスを用いて第II章【10】と同様の方法を用いて検討した。



## 引用文献

- 1) Huang L, Hung M-C, Wagner E. (ed). *Nonviral vectors for gene therapy*. Academic Press: CA (1999)
- 2) Robbins PD. (ed). *Gene therapy protocols*. Humana Press: New Jersey (1997)
- 3) Lasic DD. *Liposomes in gene delivery*. CRC Press: Florida (1997)
- 4) Kavanov AV, Felgner PL, Seymour LW. (ed). *Self-assembling complexes for gene delivery*. John Wiley & Sons: Chichester (1998)
- 5) Rogy MA, Beinhauer BG, Reinisch W, Huang L, Pokieser P. *Hum Gene Ther* **11**: 1731-1741 (2000)
- 6) Hyde SC, Southern KW, Gileadi U, Fitzjohn EM, Mofford KA, Waddell BE, Gooi HC, Goddard CA, Hannavy K, Smyth SE, Egan JJ, Sorgi FL, Huang L, Cuthbert AW, Evans MJ, Colledge HW, Higgins CF, Webb AK, Gill DR. *Gene Therapy* **7**: 1156-1165 (2000)
- 7) Knowles MR, Noone PG, Hohneker K, Johnson LG, Boucher RC, Efthimiou J, Crawford C, Brown R, Schwartzbach C, Pearlman R. *Hum Gene Ther* **9**: 249-69 (1998)
- 8) Nabel GJ, Nabel EG, Yang Z-Y, Fox BA, Plautz GE, Gao X, Haung L, Shu S, Gordon D, Chang AE. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 11307-11311 (1993)
- 9) Caplen NJ, Alton EFWF, Middleton PG, Dorin LR, Stevenson BJ, Gao X, Durham SR, Jeffery PK, Hodson ME, Coutelle C, Huang L, Porteous DJ, Williamson R, Geddes DM. *Nature Med* **1**:39-46 (1995)
- 10) Hui KM, Ang PT, Huang L, Tay SK. *Gene Therapy* **4**: 783-790 (1997)
- 11) Rubin J, Galanis E, Pitot HC, Richardson RL, Burch PA, Charboneau JW, Reading CC, Lewis BD, Stahl S, Akporiaye ET, Harris DT. *Gene Therapy* **4**: 419-425 (1997)
- 12) Porteous DJ, Dorin JR, McLachlan G, Davidson-Smith H, Davidson H, Stevenson BJ, Carothers AD, Wallace WA, Moralee S, Hoenes C, Kallmeyer G, Michaelis U, Naujoks K, Ho LP, Samways JM, Imrie M, Greening AP, Innes JA. *Gene Therapy* **4**: 210-218 (1997)
- 13) Bennett MJ, Nantz MH, Balasubramaniam RP, Gruenert DC, Malone RW. *Bioscience Reports* **15**: 47-53 (1995)
- 14) Jarnagin WR, Debs RJ, Wang SS, Bissell DM. *Nucleic Acids Res* **20**: 4205-4211 (1992)
- 15) Kawamura C, Noguchi A, Furuno T, Nakanishi M. *FEBS Lett* **421**: 69-72 (1998)
- 16) Caplen NJ, Kinrade E, Sorgi F, Gao X, Gruenert D, Geddes D, Coutelle C, Huang L, Alton EFWF, Williamson R. *Gene Therapy* **2**: 603-613 (1995)
- 17) Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN, Wheeler CJ, Tsai YJ, Border R, Ramsey P, Martin M, Felgner PL. *J Biol Chem* **269**: 2550-2561 (1994)
- 18) Harrison GS, Wang Y, Tomczak J, Hogan C, Shpall EJ, Curiel TJ, Felgner PL. *Biotechniques* **19**: 816-823 (1995)

- 19) Koltover I, Salditt T, Safinya R. *Biophys J* **77**: 915-924 (1999)
- 20) Huebner S, Battersby BJ, Grimm R, Gregor C. *Biophys J* **76**: 3158-3166 (1999)
- 21) Lasic DD, Strey H, Stuart MCA, Podgornik R, Frederik PM. *J Am Chem Soc* **199**: 832-833 (1997)
- 22) Zuidam NJ, Barenholz Y. *Biochim Biophys Acta* **1368**: 115-128 (1998)
- 23) Cortesi R, Esposito E, Menegatti E, Gambari R, Nastruzzi C. *Int J Pharm* **139**: 69-78 (1996)
- 24) Yang J-P, Huang L. *Gene Therapy* **4**: 950-960 (1997)
- 25) Sakurai F, Inoue R, Nishino Y, Okuda A, Matsumoto O, Taga T, Yamashita F, Takakura Y, Hashida M. *J Control Rel* **66**: 255-269 (2000)
- 26) Mounkes LC, Zhong W, Palacin GC, Heath TD, Debs RJ. *J Biol Chem* **273**: 26164-26170 (1998)
- 27) Matsui H, Johnson LG, Randell SH, Boucher RC. *J Biol Chem* **272**: 1117-1126 (1997)
- 28) Pratten MK, Lioyd JB. *Biochim Biophys Acta* **881**: 307-313 (1986)
- 29) Chastellier CD, Thilo L. *Eur J Cell Biol* **74**: 49-62 (1997)
- 30) Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 7413-7414 (1987)
- 31) Farhood H, Bottega R, Epand RM, Huang L. *Biochim Biophys Acta* **1111**: 239-246 (1992)
- 32) Zebner J, Fasbender Al J, Moninger T, Poellinger KA, Welsh MJ. *J Biol Chem* **270**: 18997-19007 (1995)
- 33) Xu Y, Szoka FC Jr. *Biochemistry* **35**: 5616-5623 (1996)
- 34) Mislick KA, Baldeschwieler JD. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 12349-12354 (1996)
- 35) Farhood H, Serbina N, Huang L. *Biochim Biophys Acta* **1235**: 289-295 (1995)
- 36) Noguchi A, Furuno T, Kawaura C, Nakanishi M. *FEBS Lett* **433**: 169-173 (1998)
- 37) Ouahabi A El, Thiry M, Pector V, Fuks R, Ruyschaert JM, Vandenbranden M. *FEBS Lett* **414**: 187-192 (1997)
- 38) Wattiaux R, Jadot M, Laurent N, Dubois F, Wattiaux-De CS. *Biochem Biophys Res Commun* **227**: 448-454 (1996)
- 39) Gershon H, Ghirlando R, Guttman SB, Minsky A. *Biochemistry* **32**: 7143-7151 (1993)
- 40) Sternberg B, Sorgi FL, Huang L. *FEBS Lett* **356**: 361-366 (1994)
- 41) Erbacher P, Bousser MT, Raimond J, Monsigny M, Midoux P, Roche AC. *Hum Gene Ther* **7**: 721-729 (1996)
- 42) Fillion FC, Phillips NC. *Biochim Biophys Acta* **1329**: 345-356 (1997)
- 43) Hui SW, Langner M, Zhao Y-L, Ross P, Hurley E, Chan K. *Biophys J* **71**: 590-599 (1996)
- 44) Wrobel I, Collins D. *Biochim Biophys Acta* **1235**: 296-304 (1995)
- 45) Damme M-PIV, Tiglias J, Nemat N, Preston BN. *Anal Biochem* **223**: 62-70 (1994)
- 46) Fasbender A, Marshall J, Moninger TO, Grunst T, Cheng S, Welsh J. *Gene Therapy* **4**: 716-725 (1997)
- 47) Wheeler C, Sukhu L, Yang G, Tsai Y, Bustamente C, Felgner P, Norman J, Manthorpe M. *Biochim*

*Biophys Acta* **1280**: 1-11 (1996)

- 48) Litzinger DC, Huang L. *Biochim Biophys Acta* **1113**: 201-227 (1992)
- 49) Koltover I, Salditt T, Radler JO, Safinya CR. *Science* **281**: 78-81 (1998)
- 50) Horton HM, Dorigo O, Hernandez P, Anderson D, Berek JS, Parker SE. *J Immunol* **163**: 6378-6385 (1999)
- 51) Wheeler CJ, Felgner PL, Tsai YJ, Marshall J, Sukhu L, Doh SG, Hartikka J, Nietupski J, Manthorpe M, Nichols M, Plewe M, Liang X, Norman J, Smith A, Cheng SH. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 11454-11459 (1996)
- 52) Stephan DJ, Yang Z-Y, San H, Simari RD, Wheeler CJ, Felgner PL, Gordon D, Nabel GJ, Nabel EG. *Hum Gene Ther* **7**: 1803-1812 (1996)
- 53) Horiguchi Y, Larchian WA, Kaplinsky R, Fair WR, Heston WDW. *Gene Therapy* **7**: 844-851 (2000)
- 54) Templeton NS, Lasic DD, Frederik PM, Strey HH, Roberts DD, Pavlakis GN. *Nature Biotechnol* **15**: 647-652 (1997)
- 55) Sternberg B, Hong K, Zheng W, Papahadjopoulos D. *Biochim Biophys Acta* **1375**: 23-35 (1998)
- 56) Song YK, Liu F, Chu S, Liu D. *Hum Gene Ther* **8**: 1585-1594 (1997)
- 57) Liu Y, Mounkes LC, Liggitt HD, Brown CS, Solodin I, Heath TD, Debs RJ. *Nature Biotechnol* **15**: 167-173 (1997)
- 58) Liu Y, Liggitt D, Zhong W, Tu G, Gaensler K, Debs R. *J Biol Chem* **270**: 24864-24870 (1995)
- 59) Allen TM, Cleland LG. *Biochim Biophys Acta* **597**: 418-426 (1980)
- 60) Gregoriadis G, Davis C. *Biochem Biophys Res Commun* **89**: 1287-1293 (1979)
- 61) Gregoriadis G, Kirby C, Senior J. *Biol Cell* **47**: 11-18 (1983)
- 62) Patel HM, Tuzel NS, Ryman BE. *Biochim Biophys Acta* **761**: 142-151 (1983)
- 63) Semple SC, Chonn A, Cullis P. *Biochemistry* **35**: 2521-2525 (1996)
- 64) Li S, Rizzo MA, Bhattacharya S, Huang L. *Gene Therapy* **5**: 930-937 (1998)
- 65) Li S, Tseng W-C, Stolz DB, Wu S-P, Watkins SC, Huang L. *Gene Therapy* **6**: 585-594 (1999)
- 66) Mahato RI, Kawabata K, Takakura Y, Hashida M. *J Drug Targeting* **3**: 149-157 (1995)
- 67) Ishiwata H, Suzuki N, Ando S, Kikuchi H, Kitagawa H. *J Control Rel* **69**: 139-148 (2000)
- 68) Mahato RI, Anwer K, Tagliaferri F, Meaney C, Leonard P, Wadhwa MS, Logan M, French M, Rolland A. *Hum Gene Ther* **9**: 2083-2099 (1998)
- 69) Wu ES, Jacobson K. *Biochemistry* **16**: 3936-3941 (1977)
- 70) Plank C, Mechtler K, Szoka FC Jr, Wagner E. *Hum Gene Ther* **7**: 1437-1446 (1996)
- 71) Litzinger DC, Brown JM, Wala I, Kaufman SA, Van GY, Farrell CL, Collins D. *Biochim Biophys Acta* **1281**: 139-149 (1996)
- 72) Eastman SJ, Siegel C, Tousignant J, Smith AE, Cheng SH, Scheule RK. *Biochim Biophys Acta* **1325**: 41-62 (1997)

- 73) Song YK, Liu D. *Biochim Biophys Acta* **1372**: 141-150 (1998)
- 74) Boukhnikachvili T, Aguerre-Chariol O, Airiau M, Lesieur S, Ollivon M, Vacus J. *FEBS Lett* **409**: 188-194 (1997)
- 75) Sieger DP, Banschbach J, Alford D, Ellens H, Lis LJ, Quinn PJ, Yeagal PL, Bentz J. *Biochemistry* **28**: 3703-3709 (1989)
- 76) Talbot WA, Zheng LX, Lentz BR. *Biochemistry* **36**: 5827-5836 (1997)
- 77) Aoki H, Tottori T, Sakurai F, Fuji K, Miyajima K. *Int J Pharm* **156**: 163-174 (1997)
- 78) Nicholas AR, Jones MN. *Biochim Biophys Acta* **1074**: 105-111 (1991)
- 79) McLean JW, Fox EA, Baluk P, Bolton PB, Haskell A, Pearlman R, Thurston G, Umemoto EY, McDonald DM. *Am J Physiol* **273**: H387-404 (1997)
- 80) Yoshioka T, Hashida M, Muranishi S, Sezaki H. *Int J Pharm* **81**: 131-141 (1981)
- 81) Chonn A, Semple SC, Cullis PR. *J Biol Chem* **267**: 18759-18765 (1992)
- 82) Liu D, Liu F, Song YK. *Biochim Biophys Acta* **1235**: 140-146 (1995)
- 83) Moghimi SM, Patel HM. *FEBS Lett* **233**: 143-147 (1998)
- 84) Moghimi SM, Patel HM. *Biochim Biophys Acta* **984**: 384-387 (1989)
- 85) Patel HM. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* **9**: 39-90 (1992)
- 86) Liu D, Song YK, Liu F. *Pharm Res* **12**: 1775-1780 (1995)
- 87) Barron LG, Meyer KB, Szoka FC Jr. *Hum Gene Ther* **9**: 315-323 (1998)
- 88) Tyrrell DA, Richardson VJ, Ryman BE. *Biochim Biophys Acta* **494**: 469-480 (1977)
- 89) Trask TW, Trask RP, Aguilar-Cordova E, Shine HD, Wyde PR, Goodman JC, Hamilton WJ, Rojas-Martinez A, Chen SH, Woo SL, Grossman RG. *Mol Ther* **1**: 195-203 (2000)
- 90) Khuri FR, Nemunaitis J, Ganly I, Arseneau J, Tannock IF, Romel L, Gore M, Ironside J, MacDougall RH, Heise C, Randlev B, Gillenwater AM, Bruso P, Kaye SB, Hong WK, Kirn DH. *Nature Med* **6**: 879-885 (2000)
- 91) Okada H, Pollack IF, Lotze MT, Lunsford LD, Kondziolka D, Lieberman F, Schiff D, Attanucci J, Edington H, Chambers W, Robbins P, Baar J, Kinzler D, Whiteside T, Elder E. *Hum Gene Ther* **11**: 637-653 (2000)
- 92) Morris JC, Ramsey WJ, Wildner O, Muslow HA, Aguilar-Cordova E, Blaese RM. *Hum Gene Ther* **11**: 487-503 (2000)
- 93) Shand N, Weber F, Mariani L, Bernstein M, Gianella-Borradori A, Long Z, Sorensen AG, Barbier N. *Hum Gene Ther* **10**: 2325-2335 (1999)
- 94) Clayman GL, el-Naggar AK, Lippman SM, Henderson YC, Frederick M, Merritt JA, Zumstein LA, Timmons TM, Liu TJ, Ginsberg L, Roth JA, Hong WK, Bruso P, Goepfert H. *J Clin Oncol* **16**: 2221-2232 (1998)
- 95) Schuler M, Rochlitz C, Horowitz JA, Schlegel J, Perruchoud AP, Kommos F, Bolliger CT, Kauczor

- HU, Dalquen P, Fritz MA, Swanson S, Herrmann R, Huber C. *Hum Gene Ther* **9**: 2075-2082 (1998)
- 96) Habib NA, Hodgson HJ, Lemoine N, Pignatelli M. *Hum Gene Ther* **10**: 2019-2034 (1999)
- 97) Nemunaitis J, Swisher SG, Timmons T, Connors D, Mack M, Doerksen L, Weill D, Wait J, Lawrence DD, Kemp BL, Fossella F, Glisson BS, Hong WK, Khuri FR, Kurie JM, Lee JJ, Lee JS, Nguyen DM, Nesbitt JC, Perez-Soler R, Pisters KM, Putnam JB, Richli WR, Shin DM, Walsh GL. *J Clin Oncol* **18**: 609-622 (2000)
- 98) Mastrangelo MJ, Maguire HC Jr, Eisenlohr LC, Laughlin CE, Monken CE, McCue PA, Kovatich AJ, Lattime EC. *Cancer Gene Ther* **6**: 409-422 (1999)
- 99) Galanis E, Hersh EM, Stopeck AT, Gonzalez R, Burch P, Spier C, Akporiaye ET, Rinehart JJ, Edmonson J, Sobol RE, Forscher C, Sondak VK, Lewis BD, Unger EC, O'Driscoll M, Selk L, Rubin J. *J Clin Oncol* **17**: 3313-3323 (1999)
- 100) Chang AE, Li Q, Bishop DK, Normolle DP, Redman BD, Nickoloff BJ. *Hum Gene Ther* **11**: 839-50 (2000)
- 101) Tartour E, Mehtali M, Sastre-Garau X, Joyeux I, Mathiot C, Pleau JM, Squiban P, Rochlitz C, Courtney M, Jantscheff P, Herrmann R, Pouillart P, Fridman WH, Dorval T. *Br J Cancer* **83**: 1454-1461 (2000)
- 102) Nemunaitis J, Fong T, Robbins JM, Edwards W, Paulson RS, Bruce J, Ognoskie N, Wynne D, Pike M, Kowal K, Merritt J, Andon D. *Cancer Gene Ther* **6**: 322-330 (1999)
- 103) Nemunaitis J, Fong T, Burrows F, Bruce J, Peters G, Ognoskie N, Meyer W, Wynne D, Kerr R, Pippin J, Oldham F, Ando D. *Hum Gene Ther* **10**: 1289-1298 (1999)
- 104) Nemunaitis J, Bohart C, Fong T, Meyer W, Edelman G, Paulson RS, Orr D, Jain V, O'Brien J, Kuhn J, Kowal KJ, Burkeholder S, Bruce J, Ognoskie N, Wynne D, Martineau D, Ando D. *Cancer Gene Ther* **5**: 292-300 (1998)
- 105) Abdel-Wahab Z, Weltz C, Hester D, Pickett N, Vervaert C, Barber JR, Jolly D, Seigler HF. *Cancer* **80**: 401-412 (1997)
- 106) Seigler HF, Darrow TL, Abdel-Wahab Z, Gangavalli R, Barber J. *Hum Gene Ther* **5**: 761-777 (1994)
- 107) Al-Mehdi AB, Tozawa K, Fisher AB, Shientag L, Lee A, Muschel RJ. *Nature Med* **6**: 100-102 (2000)
- 108) Thurston G, McLean JW, Rizen M, Baluk P, Haskell A, Murphy TJ, Hanahan D, McDonald DM. *J Clin Invest* **101**: 1401-1413 (1998)
- 109) Watanabe T, Sakata T. *Eur J Immunol* **18**: 1627-30 (1988)
- 110) Rosenblum MG, Yung WKA, Kelleher PJ, Ruzicka F, Steck PA, Borden EC. *J Interferon Res* **10**: 141-151 (1990)
- 111) Johns TG, Mackay IR, Callister KA, Hertzog PJ, Devenish RJ, Linnane AW. *J Natl Cancer Inst* **84**: 1185-1190 (1992)
- 112) Hayashi H, Tanaka K, Jay F, Khoury G, Jay G. *Cell* **43**: 263-267 (1985)

- 113) Riches DW, Underwood GA. *J Biol Chem* **266**: 24785-24792 (1991)
- 114) Rakesh KS, Mordechai G, Corazon DB, Richardo S, Liansa N, Isaiah JF. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 4562-4566 (1995)
- 115) Fathallah-Shaykh HM, Zhao L-J, Kafrouni AI, Smith GM, Forman J. *J Immunol* **164**: 217-222 (2000)
- 116) Albin A, Marchisone C, Grosso FD, Benelli R, Masiello L, Tacchetti C, Bono M, Ferrantini M, Rozera C, Truini M, Belardelli F, Santi L, Noonan DM. *Am J Pathol* **156**: 1381-1393 (2000)
- 117) Whitmore M, Li S, Huang L. *Gene Therapy* **6**: 1867-1875 (1999)
- 118) Dow SW, Fradkin LG, Liggitt DH, Willson AP, Heath TD, Potter TA. *J Immunol* **163**: 1552-1561 (1999)
- 119) Li S, Wu S-P, Whitmore M, Loeffert EJ, Wang L, Watkins SC, Pitt BR, Huang L. *Am J Physiol* **276**: L796-804 (1999)
- 120) Tan Y, Li S, Pitt BR, Huang L. *Hum Gene Ther* **10**: 2153-2161 (1999)
- 121) Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. *Nature* **374**: 546-549 (1995)
- 122) Klinman DM, Yi AK, Beaucage SL, Conover J, Krieg AM. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 2879-2883 (1996)
- 123) Ballas ZK, Rasmussen WL, Krieg AM. *J Immunol* **157**: 1840-1845 (1996)
- 124) Brunner C, Seiderer J, Schlamp A, Bidlingmaier M, Eigler A, Haimerl W, Lehr H-A, Krieg AM, Hartmann G, Endres S. *J Immunol* **165**: 6278-6286 (2000)
- 125) Stacey KJ, Sweet MJ, Hume DA. *J Immunol* **157**: 2116-2122 (1996)
- 126) Sester DP, Naik S, Beasley SJ, Hume DA, Stacey KJ. *J Immunol* **165**: 4165-4173 (2000)
- 127) Vabulas RM, Pircher H, Lipford GB, Hacker H, Wagner H. *J Immunol* **164**: 2372-2378 (2000)
- 128) Deng G-M, Nilsson I-M, Verdrengh M, Collins LV, Tarkowski A. *Nature Med* **5**: 702-705 (1999)
- 129) Hartmann G, Weeratna RD, Ballas ZK, Payette P, Blackwell S, Suparto I, Rasmussen WL, Waldschmidt M, Sajuthi D, Purcell RH, Davis HL, Krieg AM. *J Immunol* **164**: 1617-1624 (2000)
- 130) Watanabe Y, Kawabe Y. In: *Lymphokines and Interferons: a Practical Approach*, pp. 1. (ed) .: Clements MJ, Morris AG, Gearing JM. Elsevier, Amsterdam (1987)
- 131) Mahato RI, Kawabata K, Nomura T, Takakura Y, Hashida M. *J Pharm Sci* **84**: 1267-1271 (1995)
- 132) Chace JH, Hooker NA, Mildestein KL, Krieg AM, Cowdery JS. *Clin Immunol Immunopathol* **84**: 185-193 (1997)
- 133) DeMaeyer-Guignard J, DeMaeyer E. In: *Interferon 6*, pp. 69. (ed): Gresser I. Academic, New York (1985)
- 134) Natsume A, Mizuno M, Ryuke Y, Yoshida J. *Gene Therapy* **6**: 1626-1633 (1999)
- 135) Xu L, Xie K, Fidler IJ. *Hum Gene Ther* **9**: 2699-2708 (1998)
- 136) Colby C, Morgan MJ. *Annu Rev Microbiol* **25**: 333-360 (1971)

- 137) Kleinschmidt WJ. *Annu Rev Biochem* **41**: 517-542 (1972)
- 138) Kelly KA, Pitha PM. *Virology* **147**: 382-393 (1985)
- 139) Okamoto S, Watanabe Y, Takakura Y, Hashida M. *J Biochem* **124**: 697-701 (1998)
- 140) Hirabayashi K, Yano J, Inoue T, Yamaguchi T, Tanigawara K, Smyth GE, Ishiyama K, Ohgi T, Kimura K, Irimura T. *Cancer Res* **59**: 4325-4333 (1999)
- 141) Dong Z, Juang S-H, Kumar R, Eue I, Xie K, Bielenberg D, Lu W, Bucana C, Yang X, Fidler IJ. *Cancer Immunol Immunother* **46**: 137-146 (1998)
- 142) Dow SW, Elmslie RE, Fradkin LG, Liggitt DH, Heath TD, Willson AP, Potter TA. *Hum Gene Ther* **10**: 2961-2972 (1999)
- 143) Pilaro AM, Taub DD, McCormick KL, Williams HM, Sayers TJ, Fogler WE, Wilttrout RH. *J Immunol* **153**: 333-342 (1994)
- 144) Hardonk MJ, Dihkhuis FWJ, Hulstaert CE, Koudstaal J. *J Leukocyte Biol* **52**: 296-302 (1992)
- 145) Sambrook K, Fritsch EF, Maniatis T. (ed). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition Plainview*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: NY (1989)
- 146) Bartlett GR. *J Biol Chem* **234**: 466-468 (1959)
- 147) Wang C-S, Smith RL. *Anal Biochem* **63**: 414-417 (1975)
- 148) Mosmann T. *J Immunol Methods* **65**: 55-65 (1983)
- 149) Shinizky M, Barenholz Y. *Biochim Biophys Acta* **515**: 367-394 (1978)
- 150) 日本化学会編、コロイド科学 IVコロイド科学実験法、東京科学同人、pp. 67 (1996)
- 151) Takino T, Nagahama E, Sakaeda (ne Kakutani) T, Yamashita F, Takakura Y, Hashida M. *Int J Pharm* **114**: 43-54 (1995)
- 152) Senior JH, Trimble KR, Maskiewicz R. *Biochim Biophys Acta* **1070**: 173-179 (1991)
- 153) Fabry ME, Nagel RL, Pachins A, Suzuka S, Costantini F. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 12150-12154 (1992)
- 154) Kawabata K, Kondo M, Watanabe Y, Takakura Y, Hashida M. *Pharm Res* **14**: 483-485 (1997)
- 155) Nomura T, Yasuda K, Yamada T, Okamoto S, Mahato RI, Watanabe Y, Takakura Y, Hashida M. *Gene Therapy* **6**: 121-129 (1999)
- 156) Kawade Y, Watanabe Y. In: *The Biology of The Interferon System*, pp. 197 (ed).: Cantell K, Schellekens H. Nijhoff: Dordrecht (1987)
- 157) Spitalny GL, Havell EA. *J Exp Med* **159**: 1560-1565 (1984)